

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



EPO-BERLIN

24-03-2004

REC'D 07 APR 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 103 03 664.4

**Anmeldetag:** 23. Januar 2003

**Anmelder/Inhaber:** Nemod Immuntherapie AG, 13125 Berlin/DE

**Bezeichnung:** Erkennungsmoleküle zur Behandlung und  
Detektion von Tumoren

**IPC:** C 07 K, C 07 H, A 61 K

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 16. März 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Stanschus

---

## Erkennungsmoleküle zur Behandlung und Detektion von Tumoren

---

5

Die Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen Tumore gerichtet sind, pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Erkennungsmoleküle umfassen, Verfahren zur Herstellung der Erkennungsmoleküle und die Verwendung der Erkennungsmoleküle zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen.

Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Erkrankungen von Organismen, insbesondere von Säugern wie dem Menschen. Die erfolgreiche Behandlung der Tumorerkrankung hängt insbesondere davon ab, in welchem Entwicklungsstadium des Tumors mit der Therapie begonnen wird. Vorteilhaft ist es, wenn mit der Therapie zu einem Zeitpunkt begonnen werden kann, wenn der Tumor eine minimale Ausweitung und Ausbreitung im Körper aufweist, wobei unter Ausweitung die Individualgröße des Tumorgewebes und unter Ausbreitung die mögliche Metastasierung oder Infiltration in umliegende Organe verstanden wird. Ein Organismus, der eine Tumorerkrankung aufweist, sezerniert bestimmte komplexere Substanzen oder einfachere Moleküle, die für die Diagnose von Tumoren in einem frühen Stadium der Erkrankung - d.h. bei kleineren Tumoren - eingesetzt werden können. Die bekanntesten von diesen Strukturen sind Tumormarker. Tumormarker sind in der Regel chemische Substanzen, die mehr oder weniger spezifisch für einen bestimmten Tumortyp sind bzw. in Assoziation mit einem Tumor vermehrt

auftreten. Tumormarker können beispielsweise zellulärer Natur sein, wie zum Beispiel Onkogene, bestimmte Hormonrezeptoren oder Membranantigene, wie zum Beispiel CA 2, CA 3, CA 19-19 und andere. Tumormarker können jedoch auch humorale Marker sein, die entweder vom Tumor produziert oder vom Tumor induziert werden. Zu der Gruppe der von dem Tumor produzierten Tumormarker gehören insbesondere die Tumor-assoziierten Antigene, Hormone, Enzyme und sonstige Verbindungen. Von dem Tumor induzierte humorale Tumormarker sind beispielsweise Enzyme, wie die alkalische Phosphatase oder zum Beispiel das Akute-Phase-Protein (zum Beispiel Ferritin). Da Tumormarker im Stand der Technik vorzugsweise mit immunologischen Methoden nachgewiesen werden, wird für Tumormarker vielfach auch das Synonym Tumorantigen benutzt. Bekannte Tumorantigene sind onkofetale Antigene, Blutgruppen-assoziierte Antigene, organspezifische Antigene und die sonstigen Antigene, wie zum Beispiel CA 15-3.

Die Krebsdiagnostik mit Tumormarkern mit Erkennungsmolekülen weist mehrere Nachteile auf. So können bestimmte Tumormarker auch bei nichtkanzerogenen Krankheiten auftreten, wodurch die eingesetzten Erkennungsmoleküle eine positive Reaktion anzeigen; weiterhin bedeutet eine Nichtinteraktion der Erkennungsmoleküle nicht, dass keine Tumorkrankheit vorhanden ist. Ein weiterer Nachteil ist, dass die bekannten Erkennungsmoleküle in der Regel unspezifisch sind. Das bedeutet, dass ein positiver Nachweis nur in seltenen Fällen auf eine bestimmte Art der Tumorerkrankung weist. Ein weiterer, ganz entscheidender Nachteil der bekannten Erkennungsmoleküle ist außerdem, dass sie nur

bedingt zur Verlaufskontrolle der Entwicklung von Tumoren, beispielsweise nach einer Operation, verwendet werden können. Das heißt, die bekannten Tumormarker können in der Regel nicht zur Früherkennung oder zur Nachbehandlung, 5 insbesondere nicht zur Prophylaxe, eingesetzt werden.

Neben diesen allgemeinen Nachteilen treten bei Erkennungsmolekülen, die gegen Tumorantigene, die sich nur in ihrer Glykosylierung vom entsprechenden Antigen im 10 Normalgewebe unterscheiden, spezielle Nachteile auf. Die Antikörper müssen glykosylierungsabhängig sein und die Veränderung des Glykosylierungsstatus des Antigens im Tumor widerspiegeln. So z.B. ist die Glykosylierung von MUC1 auf Brusttumorzellen verändert. Es zeigt sich eine starke 15 Reduktion der Kettenlänge der O-Glykane und eine Reduktion der Sialinsäure O-Acetylierung.

Ein weiterer Nachteil der bekannten Erkennungsmoleküle gegen Tumormarker ist der, dass sie den Tumor erst 20 erkennbar machen, wenn dieser eine kritische Größe bereits erreicht hat. Das heißt, frühe Stadien des Tumorwachstums können mit den bekannten Erkennungsmolekülen, die gegen Tumormarker gerichtet sind, nicht bestimmt werden.

25 Das polymorphe epitheliale Muzin MUC1 ist als Gesamtmolekül ein anerkannter Tumormarker. Aufgrund der Komplexität des Moleküls, das sehr groß ist, stark glykosyliert ist, extrazellulär im wesentlichen aus einer großen polymorphen Anzahl von Tandem Repeats aus 20 Aminosäureresten besteht 30 und bezüglich der Tandem Repeats heterogen glykosyliert ist, besitzt MUC1 eine Vielzahl von Epitopen. Ein bestehender Nachteil ist, dass es nicht bekannt ist,

welches Epitop auf MUC1 als Zielstruktur zur Tumorthherapie und -diagnose optimal geeignet ist. Nachteilhaft ist weiterhin, dass herkömmliche MUC1-spezifische Antikörper, (die ein relativ gutes Erkennen von MUC1 auf bestimmten Tumoren leisten,) in hohem Maß auch solches MUC1 erkennen, das von Tumorzellen in das Serum abgegeben wird (Shedding). Diese hohe Bindung an im Serum vorliegendes MUC1 im Tumorpatienten ist offensichtlich ein Nachteil in der Therapie von Tumorerkrankungen mit solchen MUC1-spezifischen Antikörpern. Ein weiterer Nachteil ist, dass die meisten MUC1-spezifischen Antikörper auch Bindung gegen mehrere Normalgewebe zeigen.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Erkennungsmoleküle bereitzustellen, mit denen zum einen Tumore einfach, sicher und effizient detektiert werden können, und die weiterhin in der Prophylaxe, Therapie und/oder Nachbehandlung von Tumoren und/ Metastasen eingesetzt werden können, und die keine oder nur eine geringe Bindung an ins Serum abgegebenes MUC1 und keine oder eine geringe Bindung an Normalgewebe aufweisen.

Die Erfindung löst dieses technische Problem durch die Bereitstellung von Erkennungsmolekülen umfassend eine Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6 enthält, wobei die Erkennungsmoleküle das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch binden.

Die Definitionen der Begriffe, die im Folgenden gemacht werden, treffen mutatis mutandis auf zuvor gemachte, diese und die nachfolgenden Ausführungen zu.

5 Unter dem Begriff Erkennungsmolekül versteht man erfindungsgemäß ein Molekül, das, insbesondere unter stringenten Bedingungen, das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet. Stringente Bedingungen sind beispielsweise Hochsalzkonzentrationen und exzessives Waschen mit milden  
10 Detergenzien wie NP-40 oder Tween.

Unter dem „glykosylierten MUC1-Tumorepitop“ versteht man erfindungsgemäß ein Epitop, das mindestens eine PDTRP Sequenz des MUC1 Tandem Repeats umfasst und am Threonin des  
15 PDTRP mit GalNAc oder Gal-GalNAc glykosyliert ist.

Unter einer spezifischen Bindung des glykosylierten MUC1-Tumorepitops versteht man erfindungsgemäß eine Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle umfassend eine  
20 Kombination von folgenden Bindungseigenschaften :

a) Bindung in Testmethoden wie unter Beispiel 5 beschrieben an die glykosylierte PDTRP Region innerhalb einer MUC1 Tandem Repeat Sequenz, die aus 1 bis 1,5 Tandem Repeats besteht (Molekül aus 30  
25 Aminosäuren siehe Beispiel 5) und am Threonin mit GalNAc $\alpha$ 1-O-Thr (weiter als GalNAc bezeichnet) oder Gal $\beta$ 1-3GalNAc $\alpha$ 1-O-Thr (weiter als Gal-GalNAc bezeichnet) glykosyliert ist, wobei die Stärke der Bindung im Vergleich zu dem nicht-glykosylierten Peptid gleicher Länge und  
30 Peptidsequenz um ein Vielfaches erhöht wird. Definiert wird dabei eine Erhöhung um das Vielfache

indem das Bindungsverhältnis des am PDTRP glykosylierten MUC1 Glykopeptids zu dem nicht-glykosylierten Peptid in einem Test wie unter Beispiel 5.1 beschrieben (mit dem dort beschriebenen MUC1 Peptid bzw. Glykopeptid mit einer Länge von 30 Aminosäuren, die 1,5 Tandem Repeats entspricht), einen Faktor von >4,5 erreicht.

- b) Bindung in Testmethoden wie unter Beispiel 5.2 beschrieben an multiple nicht-glykosylierte MUC1 Tandem Repeats, die aus mindestens 3 Tandem Repeats bevorzugt 5 Tandem Repeats bestehen.
- c) Eine statistisch deutlich verminderte Bindung an im Serum von Colonkarzinompatienten vorkommendes MUC1, das von den Tumorzellen abgegeben wurde, im Vergleich zu Antikörpern des CA15-3 Tests (Beispiel 11) und des HMFG-1 (siehe auch Beispiel 11). Das Testverfahren hierzu ist im Beispiel 11 näher ausgeführt.
- d) Die Interaktion zwischen Antigen und Erkennungsmolekül wird wie in Beispiel 6 beschrieben durch Neuraminidase-Behandlung erhöht oder nicht beeinflusst.
- e) Es erfolgt keine oder eine nahezu nicht detektierbare Bindung an Colon-Normalgewebe und eine spezifische starke Bindung an Colontumorgewebe (siehe Beispiel 6).

Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle besitzen aufgrund der umfassten erfindungsgemäß definierten Aminosäuresequenzen, die oben und im Folgenden aufgeführt sind, eine Struktur, die die spezifische Interaktion der

Erkennungsmoleküle mit dem MUC1 in Form einer spezifischen Bindung des glykosylierten MUC1 Tumorepitops mit den beschriebenen Bindungseigenschaften bedingt.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Erkennungsmolekül eine Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 enthält, wobei das Erkennungsmolekül das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfasst das Erkennungsmolekül eine Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 6 enthält, wobei das Erkennungsmolekül das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet. Vorteilhafterweise weisen diese Erkennungsmoleküle weiterhin mindestens eine der folgenden Eigenschaften auf:

- 20 f) eine Bindungserhöhung eines Faktors von  $> 20$  nach a)
- g) eine Bindung an nichtglykosylierte multiple Tandem Repeats wie unter b) mit einem Faktor von  $> 8$  des Verhältnisses der Bindung an ein nichtglykosyliertes MUC1 Tandem Repeat mit 5 Tandem Repeats zu einem nichtglykosylierten MUC1 Peptid mit einem Tandem Repeat (Sequenz der Peptide und Testverfahren siehe Beispiel 5). Das Testverfahren zur Bestimmung des Faktors ist im Beispiel 5.2
- 25
- 30 h) eine Erhöhung der Bindungsstärke durch eine Erhöhung der Anzahl der glykosylierten Tandem



Repeats (multiple glykosylierte PDTR-Region) (siehe Beispiel 5.3).

In vorteilhafterweise besitzen die weiter bevorzugten  
5 Erkennungsmoleküle alle Bindungseigenschaften a bis h.

Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle vereinen die beschriebenen Eigenschaften und sind damit vorteilhaft für die Tumordiagnose und -therapie. Sie unterscheiden sich  
10 nicht nur aufgrund ihrer neuartigen Sequenzen, sondern ebenfalls aufgrund ihrer Feinspezifitäten gegen MUC1 von bekannten Antikörpern, indem sie spezifisch das glykosylierte MUC1-Tumorepitop binden, dabei nur geringe Bindung gegen MUC1 im Serum von Colonkarzinompatienten  
15 aufweisen und normales Colongewebe praktisch nicht und Colontumorgewebe stark binden. Darüber hinaus erkennen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle Colontumore bereits als Carzinom in situ, nicht jedoch milde Displasien und unterscheiden somit zwischen den gefährlichen Tumoren und  
20 den benignen Erkrankungen. Mit diesen Eigenschaften und ihrer hohen Affinität sind sie besonders für die therapeutische aber auch die diagnostische Anwendung geeignet und somit vorteilhaft gegenüber bekannten MUC1-Antikörpern.

25 Die Kombination der Eigenschaften der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle ist überraschend, da es bisher aus der Vielzahl der bekannten MUC1 Antikörper keine Antikörper mit entsprechenden Eigenschaften gab.

Dies zeigt die Überlegenheit der erfindungsgemäßen  
30 Erkennungsmoleküle gegenüber herkömmlichen MUC1-Antikörpern.

Herkömmliche Antikörper haben damit deutliche Nachteile gegenüber den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen, wie im Folgenden kurz beispielhaft beschrieben ist.

Beispiele für Unterschiede in der Feinspezifität: HMFG-1  
5 (US5804187, US6315997) und C595 (WO244217) binden in den unter dem Beispiel 5.1 gezeigten Untersuchungen an MUC1-Peptide unabhängig von der Glykosylierung und daher nicht an das glykosylierte MUC1-Tumorepitop. HMFG-1 beispielsweise bindet darüber hinaus auch an normales  
10 Colongewebe. Sie zeigen damit nicht die vorteilhafte Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle. SM3 (US5683674), der durch Immunisierung mit abgeleitetem MUC1 aus humanen Nichttumormaterial (Milchfetttröpfchen) stammt, bindet glykosylierte und nicht-glykosylierte MUC1-  
15 abgeleitete Peptide gemäß des Tests aus dem Beispiel 5.1 nahezu gleichermaßen mit einer leichten Erhöhung um einem Faktor von ca. 1,5 und zeigt damit nicht die vorteilhafte Bindung an das Tumorepitop. Außerdem zeigt der SM3 weder eine ausgeprägte Abhängigkeit von der Anzahl der nicht-  
20 glykosylierten noch der glykosylierten MUC1 Tandem Repeats (Beispiel 5.2 und 5.3). Der DF3 ist als MUC1 spezifischer Antikörper, der bevorzugt glykosylierungsunabhängig an MUC1-abgeleitete Peptide bindet, beschrieben (WO9320841, US5506343). Außerdem wird die Bindung des DF3 an MUC1 oder  
25 MUC1-tragende Tumorzellen durch Neuraminidase-Behandlung drastisch reduziert oder vollständig inhibiert (Dai J et al., 1998; Hinoda et al., 1992). HMFG-1 und DF-3 binden außerdem stark an Tumor-MUC1 im Serum, vor allem bei Mammakarzinompatienten, aber auch bei  
30 Colonkarzinompatienten (siehe Beispiel 11). Sie zeigen damit nicht die vorteilhaften Bindungseigenschaften der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle.

Die Charakterisierung der Erkennungsmoleküle erfolgt nach obiger Definition im Wesentlichen über Bindungseigenschaften gegenüber Colonnormal- und tumorgewebe. Dies zeigt, dass die Erkennungsmoleküle für die Therapie und Diagnostik von Colontumoren und deren Metastasen gegenüber herkömmlichen anti-MUC1 Antikörpern vorteilhaft sind. Allerdings sind die Erkennungsmoleküle nicht nur vorteilhaft für die Behandlung und Diagnose von Colonkarzinomen und anderen Gastrointestinalen Tumoren, sondern auch für andere Tumorerkrankungen und Metastasen, bevorzugt MUC1-positiven Tumorerkrankungen und Metastasen, beispielsweise Mammakarzinomen, Gastrointestinaltumoren, einschließlich Kolonkarzinomen, Magenkarzinomen, Dickdarmkrebs und Dünndarmkrebs, Pankreaskarzinomen, Ovarialkarzinomen, Lungenkrebs, Nierenzellkarzinomen, Multiples Myelom und/oder deren Metastasen. Dies wird durch die Daten des Beispiels 6 untermauert, in dem die spezifische Bindung der Erkennungsmoleküle an Tumorzellen unterschiedlicher Tumorerkrankungen gezeigt wird. Die detaillierte Beschreibung über die Bindungseigenschaften gegenüber Colonkarzinomen dient zur Verdeutlichung der Vorteile und zur Festlegung geeigneter Parameter für die Bindungscharakterisierung von erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül, das das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet:

- a) eine erste Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2 und die

Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6 enthält; und  
b) eine zweite Aminosäuresequenz, die die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8 und die  
5 Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 oder 10 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11 oder 12 enthält.

Die erste und zweite Aminosäuresequenz können dabei auf einem oder mehreren, dort bevorzugt zwei, Polypeptiden  
10 vorkommen.

Im Folgenden werden die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die das glykosylierte MUC1-Tumorepitop im Sinne der Erfindung spezifisch binden, der Einfachheit  
15 halber auch MUC1 bindende oder spezifische Erkennungsmoleküle genannt.

Die bevorzugten MUC1 bindenden Erkennungsmoleküle sind dadurch charakterisiert, dass sie ein definiertes Set von  
20 einzelnen Aminosäuresequenzen umfassen. Die Kombination der Aminosäuresequenzen bedingt eine Struktur der Erkennungsmoleküle, die als Eigenschaft die oben beschriebene Kombination von Bindungseigenschaften gegenüber dem glykosylierten MUC1 Tumorepitop aufweist. Die  
25 Aminosäuresequenz dieser Erkennungsmoleküle umfasst ein oder zwei Triplets definierter Sequenzen. Diese Sequenzen stellen die Bindungsdomänen dar und definieren die Spezifität des Erkennungsmoleküls. Das 1-Triplett-Erkennungsmolekül umfasst die Aminosäuresequenz SEQ ID NO.  
30 1 oder 2, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6. MUC1-spezifische Erkennungsmoleküle, die durch zwei Triplets definiert

sind, umfassen für das erste Triplet die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6 und für das zweite Triplet die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 oder 10 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11 oder 12. Dabei können das erste und zweite Triplet entweder auf einer oder mehreren Polypeptidketten vorkommen, die im letzteren Fall gemeinsam das bindende Erkennungsmolekül bilden. Im Weiteren werden diese Triplets im Sinne der Erfindung als Tripletsequenz 1 für die erste umfasste Aminosäuresequenz und als Tripletsequenz 2 für die zweite umfasste Aminosäuresequenz, siehe Definition a) und b) der obigen Beschreibung, bezeichnet. Das Erkennungsmolekül kann erfindungsgemäß ein Antikörper sein, insbesondere ein muriner, chimärer oder humaner IgG oder IgM, eine scFv-Struktur oder ein anderes aus Antikörpern abgeleitetes Fragment wie beispielsweise Fab, F(ab)<sub>2</sub>, Fv oder F(v)<sub>2</sub> Fragmente.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen MUC1 bindenden Erkennungsmoleküle als Tripletsequenz 1 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5.

25

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen MUC1 bindenden Erkennungsmoleküle als Tripletsequenz 1 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 6.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die erfindungsgemäßen MUC1 bindenden Erkennungsmoleküle als Triplettssequenz 1 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 und die Aminosäuresequenz  
5 SEQ ID NO. 5 und als Triplettssequenz 2 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform umfassen die  
10 erfindungsgemäßen MUC1 bindenden Erkennungsmoleküle als Triplettssequenz 1 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 6 und als Triplettssequenz 2 die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 8, die Aminosäuresequenz SEQ  
15 ID NO. 10 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 12.

Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, bei denen mindestens eine Aminosäuresequenz der SEQ ID NO. 1 bis 12 durch Mutation, Deletion und/oder  
20 Insertion verändert ist, wobei jedoch die Eigenschaft der Bindungsspezifität gegen das glykosylierte MUC1-Tumorepitop weiter besteht. Dies dient vorteilhafterweise der Verbesserung der Erkennungsmoleküle, beispielsweise in Bezug auf Affinität, Löslichkeit und/oder Produzierbarkeit.

25

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Modifikation eines Erkennungsmoleküls durch eine oder mehrere Mutationen in einer oder mehreren Aminosäuresequenzen ausgewählt aus SEQ ID NO. 1 bis 12,  
30 wobei einzelne Aminosäuren durch Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften ersetzt werden, die die 3-dimensionale Struktur der Bindungsdomäne des

Erkennungsmoleküls mit Vorteil nicht grundlegend verändern, so dass die MUC1 Spezifität des Erkennungsmoleküls erhalten bleibt. Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften im Sinne der Erfindung können in 6  
5 verschiedene Gruppen zusammengefaßt werden und sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1:** Aminosäuren mit analogen physikochemischen Eigenschaften unberücksichtigt der molekularen Größe.

10	Eigenschaft oder <u>funktionelle Gruppe</u>	Aminosäure
	aliphatisch	Glycin Alanin Valin
15		Leucin Isoleucin
	Hydroxy-Gruppe	Serin Threonin
	Carboxy-Gruppe	Asparaginsäure Glutaminsäure
20	Amid-Gruppe	Asparagin Glutamin
	Amino-Gruppe	Lysin Arginin
25	aromatisch	Phenylalanin Tyrosin Tryptophan

30 In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die MUC1 spezifisch binden, ist mindestens eine Aminosäuresequenz der Aminosäuresequenzen

SEQ ID NO. 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11 und/oder 12 durch kanonische Strukturvarianten bzw. äquivalente Strukturen mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 13 bis 31 ersetzt, wobei die SEQ ID NO. 1 oder 2 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 13 bis 20 (CDRH1), die SEQ ID NO. 3 oder 4 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 21 bis 23 (CDRH2), die SEQ ID NO. 7 oder 8 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 24 bis 29 (CDRL1) und die SEQ ID NO. 11 oder 12 durch eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 30 bis 31 (CDRL3) ersetzt ist.

Der generelle Zusammenhang zwischen einer Aminosäuresequenz und der Tertiärstruktur der von diesen Sequenzen gebildeten Loops ist dem Fachmann bekannt und wurde ausführlich untersucht [Rooman et al., 1989; Martin, Thornton, 1996]. Ein spezielles Beispiel stellen die Immunglobuline dar. Durch Analyse der Loop-Konformationen der hypervariablen Regionen (complementarity determining regions, CDRs) in der leichten und der schweren Kette von Antikörpermolekülen wurden sogenannte kanonische Klassen definiert [Chothia, Lesk, 1987; Chothia et al., 1986, 1989, 1992; Wu, Cygler, 1993]. Auf dieser Grundlage wurden die kanonischen Strukturvarianten SEQ ID NO. 13 bis 31 der SEQ ID NO 1, 2, 3, 4, 7, 8, 11 und 12 abgeleitet. Unter einer äquivalenten kanonischen Strukturvariante versteht man erfindungsgemäß Aminosäuresequenzen, die sich von den Ausgangssequenzen insoweit unterscheiden, daß an definierten Positionen mindestens eine Aminosäure ausgetauscht ist, ohne daß es zu einer Änderung der kanonischen Klasse kommt.

30

Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 1 bis 12 oder deren Modifikationen in einem MUC1 spezifischen Erkennungsmolekül



im Sinne der Erfindung bilden räumliche Strukturen aus, beispielsweise so genannte Loops, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine definierbare Tertiärstruktur und/oder Quartärstruktur besitzen. Die Bindungsregion eines Erkennungsmoleküls mit dem MUC1 Antigen wird von Aminosäureresten gebildet, die von bis zu sechs variablen Loops an der Oberfläche des Moleküls bereitgestellt werden, und die spezifisch mit MUC1 interagieren.

10

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden Erkennungsmoleküle, die MUC1 spezifisch binden, bereitgestellt, bei denen mindestens eine Sequenz der Sequenzen des Triplets weggelassen wird, die nicht unmittelbar an der Interaktion mit dem MUC1 Antigen beteiligt ist.

In einer weiteren Ausführungsform umfassen die Erkennungsmoleküle mindestens eine der Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO. 1 bis 12 oder deren oben beschriebene Varianten doppelt oder mehrfach, wobei diese Dopplungen auch als Varianten der gleichen Aminosäuresequenz vorkommen können. Alle die in diesem Abschnitt beschriebenen Erkennungsmoleküle erkennen vorteilhafterweise das Antigen MUC1 spezifisch. Im Folgenden werden auch diese Erkennungsmoleküle, die streng genommen aufgrund des Weglassens oder Vervielfältigen von Sequenzen keine Triplettssequenzen tragen, trotzdem als Triplettssequenz 1 oder Triplettssequenz 2 bezeichnet, um die Anschaulichkeit zu vereinfachen.

In einer weiteren Ausführungsform, umfassen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch binden, Aminosäuresequenzen, die eine Homologie von mindestens 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90% gegenüber den Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 12 aufweisen.

Die Erkennungsmoleküle im Sinne der Erfindung können weiterhin Gerüstsequenzen umfassen, die die umfassenden Aminosäuresequenzen Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6, oder deren oben beschriebene Varianten, voneinander trennen, und Gerüstsequenzen, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 7 oder 8 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 oder 10 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11 oder 12, oder deren oben beschriebene Varianten, voneinander trennen. Die erste und zweite Aminosäuresequenz können dabei auf einem oder mehreren, bevorzugt zwei, Polypeptidketten vorkommen. Diese Gerüstsequenzen werden im Sinne der Erfindung als Spacer oder Frameworksequenzen bezeichnet und können unterschiedliche Längen und Sequenzen haben. Dabei sind ebenfalls solche Erkennungsmoleküle ausdrücklich mit eingeschlossen, bei denen nicht alle Aminosäuresequenzen der SEQ ID NO. 1 bis 12 oder deren oben beschriebenen Varianten durch Spacer getrennt werden. Darüber hinaus haben die Erkennungsmoleküle vorzugsweise weitere flankierende Aminosäuresequenzen, die im Sinne der Erfindung auch als Gerüstsequenzen bezeichnet werden.

30

Die Gerüstsequenzen haben insbesondere die Aufgabe, die beschriebenen Aminosäuresequenzen, die für die MUC1

spezifische Bindung der Erkennungsmoleküle verantwortlich beziehungsweise beteiligt sind, in eine geeignete Anordnung und räumliche Struktur zu bringen, damit die Bindung an das MUC1 erfolgen kann. Es kann vorgesehen sein, dass die

5 Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 1 bis NO. 12 ohne mindestens eine zusätzliche Aminosäuresequenz als Gerüstsequenz das MUC1 Antigen im Sinne der Erfindung nicht spezifisch binden können. Darüber hinaus können die Gerüstsequenzen den

10 Erkennungsmolekülen z.B. die notwendige biologische und chemische Stabilität geben, damit die räumliche Struktur effektiv aufgebaut und für die Funktion und Anwendung in einer geeigneten funktionellen Form, die die MUC1 Bindung beinhaltet, erhalten werden kann.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Triplettssequenzen in bestehende Proteine durch Austausch von Aminosäuresequenzen und/oder durch Hinzufügung eingefügt, wobei die bestehenden Proteinsequenzen als Gerüstsequenzen im Sinne der Erfindung dienen,

20 beziehungsweise Gerüstsequenzen aus geeigneten Proteinen entnommen sind. Dabei können diese Gerüstsequenzen beispielsweise durch Mutationen, Deletionen oder Insertionen verändert werden. Hierbei bedient man sich dem

25 Fachmann an sich bekannter Methoden der Molekularbiologie, Biochemie und Protein-Engineering. Bevorzugte Proteine hierfür sind Proteine der Immunglobulin-Superfamilie, Protease-Inhibitoren, Lektine, Helix-Bündel-Proteine und Lipocaline, wie sie z.B. offenbart sind in: Nygren und Uhlen, 1997; Nuttall SD et al., 1999 und Skerra, 2000.

30

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die Gerüstsequenzen Antikörpergerüstsequenzen aus einer oder

verschiedenen Spezies oder Aminosäuresequenzen, die die Consensussequenz der Gerüstsequenzen muriner, humaner und/oder Antikörper anderer Säuger nachahmen. Eine Consensussequenz ist eine idealisierte Sequenz, in der  
 5 repräsentativ an jeder Position die am meisten vorkommende Aminosäure steht, wenn viele existierende Sequenzen, beispielsweise aus Antikörper-Datenbanken, miteinander verglichen werden. Dabei sind die hier bevorzugten Erkennungsmoleküle dadurch gekennzeichnet, dass die  
 10 Gerüstsequenzen für die erste Triplettssequenz 1 umfassend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6, oder deren oben beschriebene Varianten, Antikörpergerüstsequenzen der variablen schweren Kette VH,  
 15 die in der Literatur auch als Framework-Sequenzen bezeichnet werden, sind und die Gerüstsequenzen für die Triplettssequenz 2 umfassend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8, die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 oder 10 und die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11 oder 12, oder deren  
 20 oben beschriebenen Varianten, Antikörpergerüstsequenzen der variablen leichten Kette VL sind.

Bevorzugt sind weiterhin Antikörpergerüstsequenzen von Antikörpern aus Säugetieren, besonders bevorzugt sind Antikörpergerüstsequenzen humanen und/oder murinen Ursprungs.  
 25 Die Gerüstsequenzen können dabei aus Antikörpergerüstsequenzen verschiedener Spezies kombiniert werden. Diese Antikörpergerüstsequenzen sind dem Fachmann bekannt und in verschiedenen Datenbanken zugänglich wie der  
 30 Kabat-Datenbank (immuno.bme.nwu.edu) oder der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Ebenfalls können diese

Antikörpergerüststrukturen durch weitere Aminosäuren verlängert, und/oder durch eine oder mehrere Mutationen, z.B. Deletionen und/oder Insertionen, verändert werden, wobei die spezifische Bindung an das glykosylierte MUC1-Tumorepitop erhalten bleibt.

Werden in einer bevorzugten Variante der Erfindung die Triplettssequenzen mit Antikörpergerüstsequenzen kombiniert, stellt das Erkennungsmolekül eine variable Kette eines Antikörpers oder eine davon abgeleitete Struktur dar.

Besonders bevorzugte Antikörpergerüstsequenzen als Gerüstsequenzen im Sinne der Erfindung sind für die variable schwere Kette die Aminosäuresequenzen entsprechend FRH1, FRH2, FRH3 und FRH4 in Tabelle 2 und für die variable leichte Kette die Aminosäuresequenzen entsprechend FRL1, FRL2, FRL3 und FRL4 in Tabelle 2, wobei die Aminosäuresequenzen der Triplettssequenzen 1 und 2 mit den SEQ ID NO. 1 bis 12 den entsprechenden CDR-Regionen der Antikörper entsprechen. Dabei setzen sich die variable schwere (VH) bzw. leichte (VL) Antikörperkette wie folgt zusammen: die VH: FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4 und die VL: FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4. Tabelle 2 erläutert die Positionen im Detail. Die Positionen der einzelnen Aminosäuren bzw. Aminosäuresequenzen entsprechen der Nummerierung von Aminosäuren in Antikörpermolekülen nach Kabat.

Tabelle 2:

Name	Positionsbereich	Pos.	Aminosäure bzw. Aminosäuresequenz
FRH1	1 bis 30	1	E

		2	V
		3	K
		4	L
		5	V
		6	E
		7	S
		8	G
		9	G
		10	G
		11	L
		12	V
		13	Q
		14	P
		15	G
		16	G
		17	S
		18	M
		19	K
		20	L
		21	S
		22	C
		23	A oder V
		24	A, V, S oder T
		25	S
		26	G
		27	Y, F, S oder D
		28	T
		29	F, L oder I
		30	S
CDRH1	31 bis 35		SEQ ID NO. 1 oder 2 und Varianten

FRH2	36 bis 49	36	W
		37	V
		38	R
		39	Q
		40	S
		41	P
		42	E
		43	K
		44	G
		45	L
		46	E
		47	W
		48	V
		49	A
CDRH2	50 bis 65, wobei zusätzlich die Pos. 52a, 52b und 52c eingeführt sind		SEQ ID NO. 3 oder 4 und Varianten
FRH3	66 bis 94	66	R
		67	F
		68	T
		69	I
		70	S
		71	R
		72	D
		73	D oder V
		74	S
		75	K
		76	S
		77	S
		78	V

		79	Y oder S
		80	L
		81	Q
		82	M
		82a	N
		82b	N
		82c	L
		83	R
		84	A oder V
		85	E
		86	D
		87	T
		88	G
		89	I
		90	Y
		91	Y
		92	C
		93	T
		94	R, G, N, K oder S
CDRH3	95 bis 102, wobei die Pos. 100 nicht und die Pos. 99 teilweise nicht existiert		SEQ ID NO. 5 oder 6 und Varianten
FRH4	103 bis 113	103	W
		104	G
		105	Q
		106	G
		107	T
		108	T
		109	L
		110	T



		111	V
		112	S
		113	S oder A
FRL1	1 bis 23	1	D
		2	I, V oder L
		3	V
		4	M oder L
		5	T
		6	Q
		7	T oder A
		8	P oder A
		9	L oder F
		10	S
		11	L oder N
		12	P
		13	V
		14	S oder T
		15	L
		16	G
		17	D oder T
		18	Q oder S
		19	A
		20	S
		21	I
		22	S
		23	C
CDRL1	24 bis 34, wobei zusätzlich die Pos. 27a, 27b, 27c, 27d und 27e eingeführt sind		SEQ ID NO. 7 oder 8 und Varianten
FRL2	35 bis 49	35	W

		36	Y
		37	L
		38	Q
		39	K
		40	P
		41	G
		42	Q oder L
		43	S
		44	P
		45	K oder Q
		46	L
		47	L
		48	I oder V
		49	Y
CDRL2	50 bis 56		SEQ ID NO. 9 oder 10 und Varianten
FRL3	57 bis 88	57	G
		58	V
		59	P
		60	D
		61	R
		62	F
		63	S
		64	G oder S
		65	S
		66	G
		67	S
		68	G
		69	T
		70	D
		71	F

		72	T
		73	L
		74	K oder R
		75	I
		76	S
		77	R
		78	V
		79	E
		80	A
		81	E
		82	D
		83	L oder V
		84	G
		85	V
		86	Y
		87	Y
		88	C
CDRL3	89 bis 97		SEQ ID NO. 11 oder 12 und Varianten
FRL4	98 bis 108	98	F
		99	G
		100	G oder D
		101	G
		102	T
		103	K
		104	L
		105	E
		106	I oder L
		106a	K
		107	R
		108	A

Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 32 und 33 entsprechen Aminosäuresequenzen mit bevorzugten Gerüstsequenzen für die variable schwere Kette. Die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 34 und 35 entsprechen Aminosäuresequenzen mit bevorzugten Gerüstsequenzen für die variable leichte Kette. Bevorzugt ist dabei die Kombination SEQ ID NO. 32 und 34. Weiter bevorzugt ist die Kombination SEQ ID NO. 33 und 35.

10

Die zu verwendenden Techniken und Methoden zur Herstellung dieser Sequenzen sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage, geeignete Gerüstsequenzen und/oder Mutationen auszuwählen.

15

Im Sinne der Erfindung können die MUC1 spezifischen Erkennungsmoleküle in verschiedenen Formaten vorliegen. Die grundlegende Struktur des Erkennungsmoleküls sind eine oder mehrere Polypeptidketten, die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Triplettssequenz 1 oder Triplettssequenzen 1 und 2 und Gerüstsequenzen umfassen. Beispielsweise sind die Aminosäuresequenz der variablen schweren Kette mit den Gerüstsequenzen und den Triplettssequenzen 1 und die Aminosäuresequenz der variablen leichten Kette mit den Gerüstsequenzen und den Triplettssequenzen 2 nicht-kovalent oder kovalent miteinander verknüpft, und können auf einer oder mehreren Polypeptidketten liegen. Mehrere Polypeptidketten können kovalent, beispielsweise durch Disulfidbrücken, oder nicht-kovalent verbunden als Erkennungsmolekül vorliegen.

Zu den unterschiedlichen erfindungsgemäßen Formaten der Erkennungsmoleküle gehören insbesondere die Verknüpfungen der Triplettssequenzen mit Aminosäuresequenzen, die über die oben beschriebenen Gerüstsequenzen hinausgehen. In einer bevorzugten Variante umfassen daher erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle neben den Triplettssequenzen und den Gerüstsequenzen weitere Zusatzsequenzen. Zusatzsequenzen sind insbesondere Aminosäuresequenzen, die primär nicht der räumlichen Anordnung der Triplettssequenzen wie in Form der Gerüstsequenzen dienen, diese jedoch vorteilhaft durch sekundäre oder tertiäre Wechselwirkungen beeinflussen können. Beispielsweise stabilisieren Zusatzsequenzen in Form von konstanten Domänen eines Antikörpers den Antikörper und bewirken eine Dimerisierung, wodurch es zu einer verbesserten Bindung des Antikörpers kommt, oder beispielsweise bewirkt eine Fusion eines scFv mit einer Domäne eines Bakteriophagenhüllproteins eine Aktivitätssteigerung der scFv-Bindung, wie sie z.B. in Jensen KB et al., 2002 offenbart ist.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen die Erkennungsmoleküle Aminosäuresequenzen mit Gerüstsequenzen auf Antikörperbasis und neben den Triplettssequenzen weitere Zusatzsequenzen. Die Zusatzsequenzen haben insbesondere mindestens eine der folgenden Aufgaben:

- a) Verknüpfung einer Triplettssequenz mit ihren entsprechend geeigneten Gerüstsequenzen mit mindestens einer weiteren Triplettssequenz mit ihren entsprechend geeigneten Gerüstsequenzen, um beispielsweise eine Bindungsfähigkeit zu erzeugen oder zu verbessern;

b) der Stabilisierung der Domänen, beispielsweise durch einen Linker zwischen zwei Proteindomänen oder Aminosäuresequenzen, die mit anderen der gleichen oder einer zweiten Kette in Wechselwirkung treten;

5

c) Effektorfunktionen für immunologische Aufgaben, beispielsweise durch Fusion mit Fc-Teil von Antikörpern, Chemokinen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren oder Teilen davon, oder Antikörpern mit einer anderen Spezifität oder Fragmenten davon, zur Rekrutierung von Zellen des Immunsystems, beispielsweise Makrophagen, oder Teilen des Komplementsystems;

10

d) Fusion mit Tags, beispielsweise Multimerisierungssequenzen - zum Beispiel  $\mu$ -tail-Sequenz aus IgM oder Assoziationsdomäne aus p53 oder MBL - zur Multimerisierung der Core-1 bindenden Anteile für eine multivalente Bindung oder zur Aufreinigung der Erkennungsmoleküle, beispielsweise His-Tag oder zum Nachweis, beispielsweise myc-Tag oder zur Markierung oder Chelatisierung von Erkennungsmolekülen, beispielsweise durch Lysin-reiche Sequenzen.

20

Geeignete Strukturen sind dem Fachmann bekannt oder durch logische Schlußfolgerung bzw. Routineversuche aus dem Stand der Technik abzuleiten.

25

Dabei weiter bevorzugte Ausführungsformen sind erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, die folgende Formate umfassen: single chain Antikörperfragment (scFv), Fv-Fragment, (Fv)<sub>2</sub>-Fragment, Fab-Fragment, F(ab)<sub>2</sub>-Fragment, Multibody (Dia-, Tria-, Tetrabody), Immunglobulin der Isotypen IgG, IgM,

30

IgA, IgE, IgD oder deren Subklassen, beispielsweise IgG1, oder von Immunglobulinen abgeleitete Erkennungsmoleküle, die mindestens eine konstante Domäne umfassen.

- 5 Unter „Multibody“ versteht man erfindungsgemäß ein single chain Antikörperfragment, wobei die variable schwere Kette und die variable leichte Kette direkt oder durch einen Linker so miteinander verbunden sind, daß eine Zusammenlagerung der VH und der VL nicht intramolekular  
10 sondern nur intermolekular stattfinden kann und so eine Ausbildung von Dia-, Tria- und/oder Tetrabodies erfolgt.

Unter „Linker“ versteht man erfindungsgemäß eine Aminosäure oder eine Aminosäuresequenz von bis zu 20 Aminosäuren, die  
15 die variable schwere Kette und die variable leichte Kette in einem single chain Antikörperfragment verbindet.

- In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle aus einer schweren und  
20 einer leichten Polypeptidkette zusammengesetzt, wobei die Aminosäuresequenzen der schweren und leichten Kette jeweils eine der oben beschriebenen Tripletstrukturen umfassen, die die CDR Regionen des Antikörpers darstellen, die entsprechenden Antikörpergerüstsequenzen, die die  
25 Frameworksequenzen der Antikörper darstellen, und Zusatzsequenzen, die mindestens eine der konstanten Domänen des Antikörperisotyps umfassen. Die beiden Ketten können miteinander kovalente Bindungen eingehen. Die konstanten Regionen und variablen Regionen können dabei Sequenzen von  
30 Antikörpern aus einer oder verschiedenen Spezies enthalten. Es können Teile von konstanten Domänen oder ganze konstante Domänen deletiert oder mutiert sein, beispielsweise um die

Effektorfunktion der Zusatzsequenzen zu verändern, beispielsweise die Bindung an Fc-Rezeptoren zu verhindern oder zu verbessern. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Erkennungsmolekül ein muriner, chimärisierter, humanisierter, partiell humaner oder humaner Antikörper oder Antikörperfragment. Die Chimärisierung erfolgt beispielsweise durch Verknüpfung der variablen Antikörperdomänen mit konstanten Antikörperdomänen oder Fragmenten der konstanten Domäne von Antikörpern verschiedener Spezies. Bevorzugt sind Sequenzen der konstanten Domänen humaner Antikörper. Beispiele für murine Antikörper sind mIgG-Panko1 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 60 und 62 und mIgG-Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 61 und 63. Beispiele für chimäre Antikörper sind die Erkennungsmoleküle cIgG-Panko1 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 64 und 68 und cIgG-Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 65 und 69.

Die Antikörpergerüstsequenzen können so gewählt werden, dass die Sequenzen weitestgehend homolog zu humanen Antikörpersequenzen sind. Die Wahl für den Speziesursprung der Gerüstsequenzen hängt auch von der Anwendung ab. So werden für eine therapeutische Anwendung in bestimmten Bereichen möglichst große Anteile an humanen Gerüstsequenzen bevorzugt, vor allem dann, wenn eine human anti-Maus Antikörperantwort (HAMA) vermieden werden soll. In anderen therapeutischen Bereichen ist ein Xenoanteil vorteilhaft, da er das Immunsystem in einer zusätzlichen Weise stimuliert. Eine Kombination beider ist in einigen Fällen besonders geeignet, vor allem dann, wenn in einer Erstimmunisierung ein Xenoanteil vorteilhaft und bei



späteren Anwendungen ein spezieskonformer und damit humaner Anteil vorteilhaft ist.

Bevorzugt ist eine Homologie zu humanen Consensussequenzen, wobei für die variable schwere Kette die HuHIII und für die variable leichte Kette die HuKII bevorzugt wird. Besonders bevorzugt ist eine Homologie zu humanen Keimbahnsequenzen, die dem Fachmann bekannt sind und zum Beispiel über die V  
BASE Datenbank ([www.mrc-cpe.cam.ac.uk](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk)) oder die Datenbank  
des National Center for Biotechnology Information  
([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) zugänglich sind.

Die zu verwendenden Techniken und Methoden zur Herstellung dieser Sequenzen sind dem Fachmann bekannt, ebenso ist der  
Fachmann in der Lage, geeignete humane Sequenzen  
auszuwählen und/oder möglicherweise notwendige Mutationen  
der Sequenzen durchzuführen.

In einer weiteren Ausführungsform sind zusätzlich die  
Triplettssequenzen, die im allgemeinen den Bindungs-Loops  
(CDR-Regionen) entsprechen und die bevorzugt starke  
Homologien zu den entsprechenden Sequenzbereichen in der  
humanen Keimbahnsequenz haben, diesen schrittweise durch  
einfache Mutationen angeglichen, ohne die spezifische  
Bindung an das glykosylierte MUC1-Tumorepitop zu  
beeinträchtigen. Erkennungsmoleküle mit diesen Sequenzen  
werden hier als partiell humane Antikörper oder  
Antikörperfragmente bezeichnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden  
bestimmte Aminosäuren der Antikörpergerüstsequenzen einer  
Spezies durch andere ausgetauscht, um normalerweise weniger

immunogene Regionen zu generieren. Dies beinhaltet dem Fachmann an sich bekannte Technologien, beispielsweise Technologien der Humanisierung, beispielsweise CDR-Grafting, Resurfacing, Chain-Shuffling mit Mutationen und  
5 Deimmunisierung durch Mutation oder Deletion von humanen MHC Epitopen.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um ein vom IgM abgeleitetes Erkennungsmolekül mit den  
10 entsprechenden konstanten Domänen eines IgM, bevorzugt humanen Sequenzen. Im Sinne der Erfindung setzten sich Immunglobuline aus der schweren Kette und der leichten Kette eines Antikörpers zusammen, wobei bevorzugt 2 leichte und 2 schwere Ketten eine Einheit darstellen.  
15 Immunglobuline des IgM Typs bestehen meist aus 5 solchen Einheiten, die zusätzlich zu Disulfidbrücken durch die J-Kette miteinander verknüpft sind.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die J-Kette nicht vorhanden, wobei es ebenfalls zur  
20 Multimerisierung der Untereinheiten kommt, wobei hier hexa- und pentamere Strukturen vorliegen können. Beispiele für chimäre IgM Antikörper sind die Erkennungsmoleküle cIgM-Panko1 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 66 und 68 und  
25 cIgM-Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 67 und 69.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erkennungsmoleküle handelt es sich um Single chain Antikörperfragmente  
30 umfassend eine Tripletstruktur 1 mit entsprechenden oben beschriebenen Antikörpergerüstsequenzen, die die CDR Regionen des Antikörpers und Frameworksequenzen der

variablen Domäne der schweren Kette von Antikörpern darstellen, und eine Tripletstruktur 2 mit den entsprechenden oben beschriebenen Antikörpergerüstsequenzen; die die CDR Regionen des Antikörpers und Frameworksequenzen der variablen Domäne der leichten Kette von Antikörpern darstellen, die kovalent miteinander in Form eines Fusionsproteins verknüpft sind. Hierbei sind die Sequenzen direkt oder durch einen Linker miteinander verknüpft.

Bevorzugt sind hier scFv Formate ohne Linker oder mit einem Linker von 1 bis 9 Aminosäuren Länge. Diese scFv Antikörper bilden multimere Strukturen (beispielsweise Dia-, Tria-, Tetra-bodies), die im Sinne der Erfindung auch als Multibodies bezeichnet werden und zeigen aufgrund der Multivalenz eine höhere Avidität zum glykosylierten MUC1-Tumorepitop. Wie in Beispiel 8 ausgeführt bindet im radioaktiven Zellbindungstest der Multibody mit der Sequenz SEQ ID NO. 45 um ein Vielfaches besser an die Brusttumorzelllinie T47D als der scFv Antikörper mit der Sequenz SEQ ID NO. 36. Diese multivalenten Fragmente im Dia/Triabody Format sind besonders bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sind aufgrund verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften für die Tumorthherapie von Vorteil. Bevorzugte Sequenzen sind die Sequenzen SEQ ID NO. 36 bis 47. Besonders bevorzugt sind die Sequenzen SEQ ID NO. 48 bis 59.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle sind Erkennungsmoleküle, die die Sequenzen SEQ ID NO. 48 bis 59, SEQ ID NO. 61, 63, 65 oder 69 umfassen, da diese wie in den

Beispielen näher beschrieben eine Kombination aller Bindungseigenschaften a) bis h) aufweisen.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die  
 5 Erkennungsmoleküle fusioniert, chemisch gekoppelt, kovalent  
 oder nicht-kovalent assoziiert mit (i)  
 Immunglobulindomänen verschiedener Spezies, (ii)  
 Enzymmolekülen, (iii) Interaktionsdomänen, (iv)  
 Signalsequenzen, (v) Fluoreszenzfarbstoffen, (vi) Toxinen,  
 10 (vii) katalytischen Antikörpern, (viii) einem oder mehreren  
 Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit anderer  
 Spezifität, (ix) zytolytischen Komponenten, (x)  
 Immunmodulatoren, (xi) Immuneffektoren, (xii) MHC-Klasse I  
 oder Klasse II Antigenen, (xiii) Chelatoren zur  
 15 radioaktiven Markierung, (xiv) Radioisotopen, (xv)  
 Liposomen, (xvi) Transmembrandomänen, (xvii) Viren und/oder  
 Zellen. Zellen können Bakterien-, Hefe-, Pflanzen-,  
 Insekten- und/oder Säugerzellen sein. Bevorzugt sind  
 Säugerzellen wie beispielsweise murine, humane oder  
 20 Hamsterzellen. Besonders bevorzugt sind Effektorzellen.  
 „Effektorzellen“ im Sinne der Erfindung sind Zellen,  
 bevorzugt humane Zellen, die Immunreaktionen vermitteln wie  
 beispielsweise Makrophagen, Dendritische Zellen,  
 Lymphozyten und NK-Zellen. Außerdem können die  
 25 Erkennungsmoleküle insbesondere mit einem Tag fusioniert  
 sein, die die Detektion des Erkennungsmoleküls und deren  
 Aufreinigung ermöglichen, wie zum Beispiel ein Myc-Tag oder  
 ein His-Tag. Diese zusammengesetzten Moleküle werden im  
 Sinne der Erfindung als „Konstrukte“ bezeichnet.  
 30 Technologien zur Herstellung dieser Konstrukte sind dem  
 Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage,  
 geeignete Sequenzen und Komponenten auszuwählen und mit den

erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen in geeigneter Weise zu verbinden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform sind die  
5 beschriebenen Erkennungsmoleküle auf Antikörper- oder Antikörperfragment-Basis mit Peptiden oder Proteinen, die nicht von Immunglobulinen abgeleitet sind, fusioniert. Beispielsweise wird die Multimerisierungsdomäne eines Nicht-Immunglobulinmoleküls mit einem scFv fusioniert,  
10 insbesondere das C-terminale Ende der alpha-Kette des C4 Bindungsproteins, wie es bei Tonye Libyh M. et al., 1997 beschrieben ist, und somit ein multivalentes Erkennungsmolekül konstruiert.

15 In einer weiteren Ausführungsform wird ein scFv mit einer Transmembrandomäne eines Nicht-Immunglobulinmoleküls fusioniert, beispielsweise mit der Transmembrandomäne des c-erb B2, des h-PDGFR, des humanen Transferrinrezeptors oder des humanen Asialoglykoprotein-Rezeptors (Liao et al., 2000),  
20 und somit die Expression von Bindungsmolekülen auf der Oberfläche von Zellen ermöglicht.

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung umfasst erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, die weiterhin  
25 Aminosäuresequenzen umfassen, die spezifisch an Makrophagen oder andere Immuneffektorzellen binden. Beispielsweise umfassen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle weiterhin eine Antikörperbindungsstelle gegen CD64, wodurch es in Form eines bispezifischen Antikörpers beziehungsweise Antikörperfragments (Diabodies) zur Bindung von Makrophagen an  
30 MUC1 positive Tumorzellen kommt, was zu deren Bekämpfung und/oder Zerstörung führt.

Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung betrifft radioaktiv markierte MUC1 spezifische Erkennungsmoleküle. Eine bevorzugte Form sind Erkennungsmoleküle auf der Basis von Antikörpern oder Antikörperfragmenten. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind radioaktiv markierte erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle im single chain Format (einschließlich als Dia-, Tria-, Tetrabodies). Weitere bevorzugte Formen sind radioaktiv markierte single chain Antikörperfragmente und ganze Immunglobuline, beispielsweise erfindungsgemäße murine, chimäre oder humanisierte IgG oder IgM Antikörper oder murine oder humanisierte Antikörperfragmente. Die Erfindung ist selbstverständlich nicht auf diese Antikörper, die radioaktive Markierung und diese Formate der Antikörper beschränkt.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um radioaktiv-markierte oder Toxin-markierte Erkennungsmoleküle, die xenogene Anteile, beispielsweise murine Anteile, im Fc Teil des Antikörpers besitzen, damit die radioaktiven Antikörper im Menschen im Blut eine kürzere Verweildauer haben und schneller ausgeschieden werden. Beispiele hierfür sind die Erkennungsmoleküle mIgG-Pankol bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 60 und 62 und mIgG-Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 61 und 63. Eine weiter bevorzugte Variante sind solche Erkennungsmoleküle auf Antikörperbasis, bei denen die murinen Anteile minimiert sind, jedoch die murinen Anteile enthalten, die für die Entfernung aus dem Blut (clearance) verantwortlich sind. Dem Fachmann ist bekannt wie er die entsprechenden Anteile ermittelt.

Antikörperfragmente wie die bevorzugten multivalenten scFv Fragmente insbesondere ohne oder mit sehr kurzem Linker bieten gegenüber intakten monoklonalen Antikörpern einen Vorteil für das Targeting von soliden Tumoren. Bei intakten Antikörpern, die in Biodistributionsstudien eine spezifische Anreicherung im Tumoreal zeigen, fällt bei genauer Untersuchung des Tumors eine inhomogene Antikörperverteilung mit vornehmlicher Anreicherung im Randbereich auf. Zentral gelegene Tumoranteile werden aufgrund von Tumornekrosen, inhomogener Antigenverteilung sowie einem erhöhten interstitiellen Gewebedruck mit diesen Antikörperkonstrukten nicht erreicht. Kleinere Antikörperfragmente zeigen dagegen eine schnelle Tumormarkierung, dringen tiefer in den Tumor ein und werden gleichzeitig relativ schnell aus der Blutbahn entfernt. Die Dissoziationskonstante von monovalenten Antikörperfragmenten wie Fabs oder scFv ist allerdings oftmals zu niedrig, was in einer kurzen Verweildauer an den Tumorzellen resultiert. Deshalb bieten multivalente Antikörperfragmente und -konstrukte wie beispielsweise Multibodies (Diabodies, Tria/Tetrabodies),  $F(ab')_2$  und andere Minibodies (multivalente Antikörperkonstrukte bestehend aus der Bindungsdomäne und einer Multimerisierungssequenz, beispielsweise scFv und CH3 Domäne eines IgG) in der Tumorthherapie viele Vorteile. Multivalenten Antikörperfragmente im Dia/Triabody Format (Multibodies) sind bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung und sind aufgrund verbesserter pharmakokinetischer Eigenschaften für die Tumorthherapie von Vorteil und wurden zur Verwendung in der Tumorthherapie weiter entwickelt. Sie können als Vehikel für die

spezifische Anreicherung von zum Beispiel zytotoxischen Substanzen wie Chemotherapeutika oder Radionuklide im Tumor verwendet werden. Durch geeignete Radionuklidwahl können Tumorzellen über eine Distanz von mehreren Zelldurchmessern abgetötet werden, wodurch auch Antigen-negative Tumorzellen in einem Tumoreal erfasst und die schlechte Penetration der Antikörper in solide Tumoren zumindest teilweise ausgeglichen werden können.

- 10 Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind radioaktiv markierte Multibodies, die besonders vorteilhafte pharmakokinetischen Eigenschaften vereinen mit einer in der Kombination gegenüber ganzen Immunglobulinen und scFv verbesserten Tumorretention, Tumorpenetration, 15 Serumhalbwertszeit und Serum zu Tumor- Verteilungsverhältnis. Weitere Vorteile sind die hohe Avidität und die bakterielle Expression, die es erlaubt, kostengünstig diese Erkennungsmoleküle herzustellen. Damit eignet sich dieses besondere Format der erfindungsgemäßen 20 Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise bevorzugt für die Behandlung von kleinen Primärtumoren, Metastasen und minimal residual Erkrankungen.

- Eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind nicht 25 radioaktiv markierte Erkennungsmoleküle. Eine bevorzugte Form hierbei sind Erkennungsmoleküle auf der Basis von Antikörpern oder Antikörperfragmenten.

- Weitere bevorzugte Ausführungsformen sind toxin- oder 30 Zytostatika-gekoppelte erfindungsgemäße chimärisierte oder humanisierte IgG und IgM basierte Erkennungsmoleküle und im Besonderen Multibodies (Dia- Tria-, Tetrabodies) mit



besonders vorteilhaften pharmakokinetischen Eigenschaften wie oben ausgeführt.

5 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform sind Liposomen, die beispielsweise mit Toxinen oder Zytostatika beladen sind, und die auf ihrer Oberfläche erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen.

10 Der Fachmann ist in der Lage, geeignete Radioisotope, Toxine und Zytostatika auszuwählen. Geeignete Techniken, Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

15 Eine weitere bevorzugte Ausführungsform der Erfindung sind Effektorzellen des Immunsystems, auf deren Oberfläche erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle gebunden sind, die die Effektorzellen zu MUC1 tragenden Tumorzellen dirigieren/adressieren und dadurch deren Bekämpfung und/oder Zerstören vermitteln. Bevorzugte Effektorzellen  
20 sind Makrophagen, dendritische Zellen und NK-Zellen, die aus dem Patienten gewonnen werden und ex vivo mit den Erkennungsmolekülen gekoppelt werden. Weiter bevorzugt sind Zelllinien dieser Zelltypen. Die Kopplung erfolgt beispielsweise durch bispezifische Erkennungsmoleküle, die  
25 neben den MUC1 spezifischen Anteilen weiterhin Aminosäuren umfassen, die eine Bindung an die Effektorzellen vermitteln. Beispielsweise sind dies bispezifische Antikörper, Komplementanteile oder konstante Domänen von Antikörpern.

30

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind hierbei Makrophagen aus dem Patienten, die nach Gewinnung mit einem

bispezifischen Antikörper beispielsweise in Form ganzer Antikörper, bevorzugt chemisch gekoppelter Fab-Fragmente oder weiter bevorzugt Diabodies, die zum einen CD64 erkennen und zum anderen erfindungsgemäß MUC1 spezifisch sind. Diese Makrophagen, die über die CD64 Spezifität die bispezifischen Erkennungsmoleküle tragen, werden dem Patienten in einer geeigneten Formulierung wieder zugeführt, um den MUC1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt. Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Makrophagen aus dem Patienten, die nach Gewinnung mit einem erfindungsgemäßen MUC1 spezifischen Antikörper oder Antikörperfragment, die den konstanten Teil eines Antikörpers umfassen, der an Makrophagen über die an sich bekannten Fc-Rezeptoren bindet. Dabei können die Erkennungsmoleküle entweder als ganze Antikörper, bevorzugt chimäre oder humanisierte IgG oder IgM, oder als Antikörperfragment, beispielsweise scFv, Fab oder Multibodies in Form eines Fusionsproteins oder chemisch gekoppelt mit dem dem Fachmann bekannten Teil der konstanten Domäne von Antikörpern, an die Makrophagen binden. Diese die Erkennungsmoleküle tragenden Makrophagen werden dem Patienten in einer geeigneten Formulierung wieder zugeführt, um den MUC1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform sind Zelllinien oder Zellen aus dem Körper wie die oben beschriebenen Effektorzellen, die mit Molekülen transfiziert werden, die

erfindungsgemäße MUC1 spezifische Erkennungsmoleküle und weiterhin Elemente umfassen, die eine Expression und eine Verankerung in der Membran bewirken, beispielsweise transmembrane Domäne, und die Aktivierung der Effektorzellen bei Kontakt mit einer MUC1 tragenden Tumorzelle vermitteln. Die entsprechenden Elemente sind dem Fachmann bekannt. Beispielsweise wird eine dendritische Zelllinie mit einem Vektor transfiziert, der ein Erkennungsmolekül umfasst, das ein erfindungsgemäßes scFv oder Multibody und eine Transmembrandomäne und eine aktivierende Domäne umfasst. In einem anderen Beispiel werden dazu Makrophagen viral transfiziert. Diese die Erkennungsmoleküle tragenden Effektorzellen werden einem Patienten in einer geeigneten Formulierung zugeführt um den MUC1 positiven Tumor zu bekämpfen. Die hierzu verwendeten Techniken und die geeigneten Verfahren, Dosierungen und Formulierungen sind dem Fachmann bekannt.

Die Erfindung betrifft auch Nukleinsäuremoleküle, die ein oder mehrere genetische Sequenzen umfassen, die mindestens eines der oben beschriebenen erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle und/oder Konstrukte kodieren. Aufgrund des degenerierten genetischen Codes können diese Nukleinsäuremoleküle sehr unterschiedliche Sequenzen haben. Die Wahl der Codons ist ebenfalls von der Zelle abhängig, die für die Herstellung des Erkennungsmoleküls verwendet wird, da in unterschiedlichen Zellen aus unterschiedlichen Organismen häufig unterschiedliche Codons bevorzugt werden und die Expressionsrate stark beeinflusst werden kann, beispielsweise sind die in eukaryontischen Genen bevorzugt verwendeten Codons AGA und AGG für Arginin in Bakterien nur selten vertreten. Hier treten die Codons CGC und CGU

deutlich häufiger auf. Das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül ist in bevorzugten Ausführungsformen eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA. Die Kriterien zur Wahl geeigneter Codons und die Herstellung eines geeigneten Nukleinsäuremoleküls sind dem Fachmann bekannt.

Weiterhin betrifft die Erfindung Vektoren zur Expression der Erkennungsmoleküle insbesondere in Zellen. Unter einem Vektor versteht man im Sinne der Erfindung ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, das zur Expression des Erkennungsmoleküls dient und das eine Nukleinsäuresequenz, die ein oder mehrere genetische Sequenzen umfasst, die mindestens eines der oben beschriebenen Erkennungsmoleküle kodieren, und insbesondere mindestens einen Promotor umfasst, der die Expression des Erkennungsmoleküls bewirkt. Vektoren können dabei selbstverständlich weitere Elemente umfassen, die dem Fachmann bekannt sind und die beispielsweise der Vermehrung von Vektoren zur Herstellung in geeigneten Zellen und zur Klonierung dienen. Die Nukleinsäuresequenzen können auf einem oder mehreren Vektoren vorliegen, beispielsweise wird in einer bevorzugten Ausführungsform die schwere Kette eines erfindungsgemäßen Immunglobulins durch einen und die leichte Kette durch einen anderen Vektor kodiert. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung sind die variable Domäne der leichten Kette und die variable Domäne der schweren Kette auf dem gleichen Vektor unter einem Promotor als Fusionsprotein kodiert. Außerdem können im Sinne der Erfindung Nukleinsäuresequenzen, die Teile eines Erkennungsmoleküls kodieren, durch unterschiedliche dem Fachmann bekannte Promotoren exprimiert werden. In einer

weiteren Ausführungsform können die unterschiedlichen Nukleinsäuresequenzen auf einem gemeinsamen Vektor liegen. Dabei kann jede Sequenz durch einen eigenen, gleichen oder unterschiedlichen, Promotor exprimiert werden oder die

5 Sequenzen können in einem bicistronischen Vektor unter einem Promotor vorliegen. Bevorzugt werden durch die unterschiedlichen Promotoren unterschiedliche Expressionsraten der Teile der Erkennungsmoleküle erreicht, die eine Bildung des gesamten Erkennungsmoleküls gegenüber

10 einer gleichen Expressionsrate der verschiedenen Teile verbessert. Weiterhin bevorzugt werden Promotoren verwendet, die induzierbar sind, um eine Expression des Erkennungsmoleküls zu verbessern. Besonders bevorzugt umfassen die Vektoren weiterhin andere dem Fachmann

15 bekannte regulatorische Elemente, beispielsweise Enhancer, die die Expression des Erkennungsmoleküls oder Teile davon verstärken, beispielsweise der CMV Enhancer oder Immunglobulin-Enhancer-Sequenzen. Bevorzugt umfassen die Nukleinsäuremoleküle und Vektoren zusätzlich

20 Nukleinsäuresequenzen, die als Signalsequenzen zur Sekretion des Erkennungsmoleküls oder Teilen davon dienen, die dem Fachmann an sich bekannt sind, beispielsweise PelB, OmpA oder MalE für prokaryontische Zellsysteme bzw. das Signalpeptid des T-Zellrezeptors, der Immunglobulinketten,

25 des t-PA oder EPO für eukaryontische Zellsysteme [Boel et al., 2000; Herrera et al., 2000]. Dies erleichtert vorteilhafterweise die Reinigung und/oder verbessert die Ausbeute der Erkennungsmoleküle. Die Verfahren zur Herstellung der oben beschriebenen Nukleinsäuren und

30 Vektoren, geeigneter Promotoren, Enhancer und Vektorkonstrukte sowie die Kriterien zu deren Wahl sind dem

Fachmann bekannt und werden in den Beispielen näher erläutert.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung umfasst  
5 der erfindungsgemäße Vektor weiterhin Nukleinsäuresequenzen, die für virale Proteine kodieren. Als eine besondere Form eines Vektors wird dabei der Virus selbst bezeichnet, dessen genetisches Material eine Nukleinsäuresequenz umfasst, die für ein erfindungsgemäßes  
10 Erkennungsmolekül kodiert. In einer bevorzugten Form ist das Erkennungsmolekül ein Fusionsprotein mit einem Virushüllprotein oder Teilen davon, das es ermöglicht, dass nicht nur das genetische Material die Nukleinsäuresequenz des Erkennungsmoleküls umfasst, sondern auch das  
15 Erkennungsmolekül selbst auf der Oberfläche des Virus bindungsaktiv vorliegt, beispielsweise ein erfindungsgemäßes scFv Erkennungsmolekül als Fusionsprotein mit einem Hüllprotein von für gentherapeutische Anwendungen geeigneten Adenoviren, Poxviren oder Vacciniaviren. Dies  
20 vermittelt die Adressierung des Virus zu einer MUC1 exprimierenden Tumorzelle, wodurch es zur Expression des Erkennungsmoleküls in der Tumorzelle kommt. Dies kann zur Expression des Erkennungsmoleküls in vivo im Organismus oder in vitro in der Zellkultur verwendet werden. Bevorzugt  
25 werden dabei bekannte Systeme verwendet, die einen Helfervirus zur Replikation verwenden, um beispielsweise die Sicherheit eines diesen Vektor umfassenden gentherapeutischen Verfahrens zu gewährleisten. Die Verfahren zur Herstellung der beschriebenen viralen  
30 Vektoren, zur Infektion und Expression der Erkennungsmoleküle sind dem Fachmann bekannt.

In einer weiteren besonderen Ausführungsform umfasst der erfindungsgemäße Vektor ein Fusionsprotein aus einem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül und einem Protein oder Peptid, das spezifisch an ein Virus bindet. Die gewonnenen  
5 Erkennungsmoleküle können so mit Vorteil zur Adressierung des Virus an eine MUC1 exprimierende Zelle verwendet werden. So kann z.B. der Transfer des genetischen Materials über Infektionen vermittelt werden, wodurch es ermöglicht wird, spezifische Moleküle, die durch das genetische  
10 Material des Virus kodiert werden, in den Zellen in vivo im Organismus in Form einer Gentherapie oder in vitro in der Zellkultur zu exprimieren.

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur  
15 Gewinnung der Erkennungsmoleküle umfassend das Einbringen von ein oder mehreren erfindungsgemäßen Vektoren, die ein oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuremoleküle enthalten, in eine geeignete Wirtszelle, die Kultivierung dieser Wirtszelle unter geeigneten Bedingungen und die  
20 Bereitstellung von ein oder mehreren Erkennungsmolekülen aus den Zellen oder dem Kulturmedium. Unter dem Begriff „Einbringen von Vektoren“ versteht man im Sinne der Erfindung dem Fachmann an sich bekannte Technologien mit denen der Vektor in eine Wirtszelle gebracht wird,  
25 beispielsweise Elektroporation, Transfektion unter Verwendung kationischer Lipide oder Infektion und dort transient oder stabil verbleibt. Unter dem Begriff „Bereitstellung von einem oder mehreren Erkennungsmolekülen“ versteht man im Sinne der Erfindung dem Fachmann an sich  
30 bekannte Technologien mit denen die während des Kultivierungsprozesses exprimierten Erkennungsmoleküle aus dem Kulturüberstand und/oder Zellen gewonnen werden,

beispielsweise unterschiedliche proteinchemische  
 Reinigungsschritte beispielsweise Fraktionierung,  
 Konzentrierung, Fällungen, und/oder Chromatographie. Die in  
 dem Verfahren zu verwendenden Techniken und Methoden sind  
 5 dem Fachmann bekannt, ebenso ist der Fachmann in der Lage,  
 geeignete Wirtszellen und Kultivierungsbedingungen sowie  
 Methoden zur Bereitstellung aus den Zellen und/oder dem  
 Kulturüberstand auszuwählen. Hierbei wählt der Fachmann  
 beispielsweise, wie bereits oben ausgeführt,  
 10 Nukleinsäuresequenzen mit geeigneten Codons und  
 Promotorsequenzen abgestimmt auf die Wirtszelle, um eine  
 möglichst starke Expression von aktiven Erkennungsmolekülen  
 zu gewinnen. In einer bevorzugten Ausführungsform verwendet  
 der Fachmann beispielsweise affinitätschromatographische  
 15 Schritte, beispielsweise Chromatographie an Protein A oder  
 Protein G oder Protein L oder beispielsweise Metallionen-  
 Affinitätschromatographie über einen zusätzlich eingefügten  
 His-Tag. In den Beispielen ist dies beispielhaft näher  
 ausgeführt.

20 Der Begriff "Gewinnung" umfasst neben den zuvor explizit  
 genannten Schritten auch zusätzliche Schritte, wie etwa  
 Vorbehandlungen des Ausgangsstoffes oder Weiterbehandlungen  
 des Endproduktes. Vorbehandlungsverfahren sind an sich dem  
 25 Fachmann bekannt. Weiterbehandlungsverfahren umfassen neben  
 den oben beschrieben Bereitstellungsverfahren  
 beispielsweise auch die endgültige Zusammensetzungen  
 und/oder Formulierung des mit dem Herstellungsverfahren  
 gewonnenen Erkennungsmoleküls in geeigneten Verwendungs-  
 30 und/oder Darreichungsformen. Die Art der Verwendungs- oder  
 Darreichungsform, z.B. Lösung, Lyophilisat oder Tablette,  
 hängt hierbei von der beabsichtigten Verwendung ab. Dem



Fachmann ist hierbei bekannt, welche Darreichungsform sich für welchen Verwendungszweck eignet. Je nach Darreichungsform kann das durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellte Erkennungsmolekül zusammen mit 5 Hilfs-, Träger- oder weiteren Wirkstoffen vorliegen. Hilfsstoffe sind hierbei vorzugsweise Adjuvantien, weitere Wirkstoffe, vorzugsweise immunstimulatorische Moleküle, wie Interleukine. Das mit dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellte Erkennungsmolekül kann auch in 10 Weiterbehandlungsschritten chemisch modifiziert werden. Vorzugsweise wird das Erkennungsmolekül hierbei mit einem oder mehreren weiteren Molekülen in geeigneter Weise, d.h. durch chemische oder physikalische Interaktion, verbunden. Als weitere Moleküle im Sinne der Erfindung dienen 15 bevorzugt anderen Proteine oder Peptide, die mit dem durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Erkennungsmolekül kovalent oder nicht-kovalent verknüpft werden, beispielsweise um bispezifische Erkennungsmoleküle herzustellen, indem ein erfindungsgemäßes 20 Erkennungsmolekül, das spezifisch das MUC1 Antigen erkennt, mit einem zweiten Molekül verknüpft wird, das beispielsweise eine Immuneffektorzelle (beispielsweise Makrophage, NK-Zellen, Dendritische Zellen) spezifisch bindet oder beispielsweise eine Verknüpfung mit 25 Interleukinen (beispielsweise IL-2, IL-7, IL-12, IL-15), Chemokinen oder Wachstumsfaktoren, wodurch über die Wirkung dieser Moleküle über die Bindung des erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls Immuneffektoren an die Core-1 positiven Tumorzellen dirigiert werden und diese beispielsweise 30 bekämpfen und/oder zerstören. Diese weiteren Moleküle oder Teile davon können wie bereits weiter oben beschrieben auch Teil des Erkennungsmoleküls selbst sein und werden in

diesem Fall nicht über die hier beschriebenen chemischen oder physikalischen Methoden nach der Expression des Erkennungsmoleküls verknüpft. Unter „Immuneffektoren“ versteht man im Sinne der Erfindung solche Komponenten der Erfindung die direkt oder indirekt eine Bekämpfung und/oder Zerstörung von MUC1 positiven Tumorzellen bewirken können, beispielsweise Immuneffektorzellen, wie beispielsweise Makrophagen, NK-Zellen, Dendritische Zellen, oder Effektormoleküle, wie beispielsweise Proteine oder Peptide des Komplementsystems. Als weitere Moleküle im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind besonders Substanzen geeignet, die eine therapeutische oder diagnostische Wirkung entfalten, beispielsweise Radioisotope oder Toxine. Diese Substanzen werden über an sich bekannte Verfahren mit den Erkennungsmolekülen verknüpft, beispielsweise werden Radioisotope entweder direkt eingelagert (beispielsweise Iod) oder über einen kovalent gekoppelten Chelator (beispielsweise Yttrium, Indium, Bismut) gebunden. Die Schritte des Weiterbehandlungsverfahrens sind dem Fachmann bekannt.

Die zur Expression der Erkennungsmoleküle erfindungsgemäß verwendeten Zellen können prokaryontische oder eukaryontische Zellen sein, beispielsweise Bakterien-, Hefe- (bevorzugt *S.cerevisiae* oder *P.pastoris*), Insekten- (*D.melanogaster*), Pflanzen-, Säugerzellen (bevorzugt Hamster-, Maus- oder humane Zelllinien) oder Organismen wie transgene Tiere und Pflanzen. Vorzugsweise werden zur Expression der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle in einem prokaryontischen System *E.coli* und zur Expression in einem eukaryontischen System die Säugerzelllinien NS0,

SP2/0, CHO-K1, CHOdhr-, COS-1, COS-7, HEK293, K562, Namalwa oder Percy 6 verwendet.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Wirtszellen, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt wurden und mit Hilfe derer erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle hergestellt werden können. Selbstverständlich können die Wirtszellen Teil eines Klon sein oder ihn selber darstellen. Die Erfindung betrifft auch Organismen, die erfindungsgemäße Wirtszellen umfassen. Die zu verwendenden Techniken und Methoden zur Herstellung dieser Organismen sind dem Fachmann bekannt.

Die Erfindung betrifft weiterhin Zusammensetzungen für therapeutische, prophylaktische oder diagnostische Zwecke umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül in einer geeigneten, insbesondere einer pharmazeutisch geeigneten Form oder Zusammensetzung. Die pharmazeutische Zusammensetzung umfaßt insbesondere zusätzliche Stoffe und Substanzen, beispielsweise medizinische und/oder pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe. Im Sinne der Erfindung gelten als Arzneimittel sowohl solche pharmazeutischen Zusammensetzungen, die für therapeutische und prophylaktische Zwecke verwendet werden, als auch solche pharmazeutischen Zusammensetzungen, die in vivo als Diagnostikum eingesetzt werden. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform handelt es sich um Zusammensetzungen für die ex vivo Diagnostik die zusätzliche Stoffe und Substanzen enthalten können. Diese Ausführungsform ist unter der Beschreibung für die Diagnostika näher ausgeführt.

„Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen“, die vorliegend synonym verwendet werden, sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen, die dazu bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu heilen, zu lindern oder zu verhüten. Medizinische Hilfsstoffe sind erfindungsgemäß solche Stoffe, die zur Produktion als aktive Ingredienzien von Arzneimitteln eingesetzt werden. Pharmazeutisch-technische Hilfsstoffe dienen der geeigneten Formulierung des Arzneimittels oder der pharmazeutischen Zusammensetzung und können sogar, sofern sie nur während des Herstellungsverfahrens benötigt werden, anschließend entfernt werden oder können als pharmazeutisch verträgliche Träger Teil der pharmazeutischen Zusammensetzung sein. Beispiele für pharmazeutisch verträgliche Träger sind nachstehend aufgeführt. Die Arzneimittelformulierung oder Formulierung der pharmazeutischen Zusammensetzung erfolgt gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Verdünnungsmittel. Beispiele für geeignete pharmazeutisch verträgliche Träger sind dem Fachmann bekannt und umfassen z.B. Phosphat-gepufferte Kochsalzlösungen, Wasser, Emulsionen wie z.B. Öl/Wasser-Emulsionen, verschiedene Arten von Detergenzien, sterile Lösungen, etc. Arzneimittel oder pharmazeutische Zusammensetzungen, die solche Träger umfassen, können mittels bekannter konventioneller Methoden formuliert werden. Diese Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen können einem Individuum in einer geeigneten Dosis verabreicht werden, beispielsweise in einem Bereich von  $1\mu\text{g}$  bis 10 g an Erkennungsmolekülen pro Tag und Patient. Bevorzugt werden dabei Dosen von 1 mg bis

1 g. Bevorzugt wird eine Verabreichung von möglichst  
wenigen und niedrigen Dosen und weiter bevorzugt eine  
einmalige Dosis, beispielsweise eines radioaktiv-markierten  
Erkennungsmoleküls. Die Verabreichung kann auf  
5 verschiedenen Wegen erfolgen, beispielsweise intravenös,  
intraperitoneal, intrarektal, intragastrointestinal,  
intranodal, intramuskulär, lokal, beispielsweise in den  
Tumor, aber auch subkutan, intradermal oder auf der Haut  
oder über die Schleimhäute. Die Verabreichung von  
10 Nukleinsäuren kann auch in Form von Gen-Therapie geschehen,  
beispielsweise über weiter oben beschriebene virale  
Vektoren. Die Art der Dosierung und des Verabreichungsweges  
kann vom behandelnden Arzt entsprechend den klinischen  
Faktoren bestimmt werden. Es ist dem Fachmann bekannt, dass  
15 die Art der Dosierung von verschiedenen Faktoren abhängig  
ist, wie z.B. der Größe, der Körperoberfläche, dem Alter,  
dem Geschlecht oder der allgemeinen Gesundheit des  
Patienten; aber auch von dem speziellen Mittel, welches  
verabreicht wird, der Dauer und Art der Verabreichung und  
20 von anderen Medikamenten, die möglicherweise parallel  
verabreicht werden.

Eine „Vakzinen-Zusammensetzung“ ist eine pharmazeutische  
Zusammensetzung zur prophylaktischen oder therapeutischen  
25 aktiven Immunisierung von Patienten, um über das  
immunologische Netzwerk eine spezifische Immunantwort gegen  
das glykosylierte MUC1-Tumorepitop im Patienten  
hervorzurufen.

30 Die pharmazeutischen Zusammensetzungen oder das  
Arzneimittel umfasst insbesondere eine pharmakologische  
Substanz, die ein oder mehrere erfindungsgemäße

Erkennungsmoleküle oder/und diese kodierende Nukleinsäuremoleküle in einer geeigneten Lösung oder Verabreichungsform enthält. Diese können entweder alleine mit den entsprechenden unter Arzneimitteln oder pharmazeutischen Zusammensetzungen beschriebenen Hilfsstoffen oder in Kombination mit einem oder mehreren Adjuvantien, beispielsweise QS-21, GPI-0100 oder andere Saponine, Wasser-Öl Emulsionen wie beispielsweise Montanide Adjuvantien, Polylysin, Polyargininverbindungen, DNA-Verbindungen wie beispielsweise CpG, Detox, bakterielle Vakzine wie beispielsweise Thyphusvakzine oder BCG-Vakzine, Salze wie beispielsweise Kalziumphosphate und/oder einem anderen geeigneten Stoff zur Wirkungsverstärkung verabreicht werden; vorzugsweise immunstimulatorische Moleküle, wie Interleukine, beispielsweise IL-2, IL-12, IL-4 und/oder Wachstumsfaktoren, beispielsweise GM-CSF. Diese werden in bekannten Methoden mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen gemischt und in einer geeigneten Formulierung und Dosierung verabreicht. Formulierungen, Dosierungen und geeignete Komponenten sind dem Fachmann bekannt.

Die pharmazeutische Zusammensetzung oder das Arzneimittel kann selbstverständlich auch eine Kombination von 2 oder mehreren der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen oder Arzneimittel sein, sowie eine Kombination mit anderen Arzneimitteln, Tumorstoffen oder Tumorbehandlungen, wie beispielsweise Antikörpertherapien, Chemotherapien oder Radiotherapien, die auf eine geeignete Weise zeitlich gemeinsam oder getrennt verabreicht beziehungsweise angewandt werden. Herstellung der

Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen erfolgt nach an sich bekannten Methoden.

Die Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen werden zur Prophylaxe oder Behandlung von Tumorerkrankungen und/oder Metastasen eingesetzt, insbesondere zur Behandlung von MUC1 positiven Tumorerkrankungen und Metastasen, wie beispielsweise Mammakarzinome, Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Dickdarmkrebs und Dünndarmkrebs, Pankreaskarzinome, Ovarialkarzinome, Leberkarzinome, Lungenkrebs, Nierenzellkarzinome, Multiples Myelom. Die Behandlung geht beispielsweise gegen Primärtumoren, minimal residuale Tumorerkrankungen, Relapses und/oder Metastasen. Die Behandlung der Tumoren kann auch als adjuvante Behandlung erfolgen. Die Verwendung der Arzneimittel kann auch zur Prophylaxe von MUC1 positiven Tumorerkrankungen erfolgen. Die prophylaktische Anwendung zielt beispielsweise auf eine Prophylaxe des Tumors sowie von Metastasen. Die Tumormittel werden in einer geeigneten Form nach bekannten Methoden verabreicht. Eine bevorzugte Variante ist die Injektion beziehungsweise Verabreichung der Arzneimittel intravenös, lokal in Körperkavitäten, beispielsweise intraperitoneal, intrarektal, intragastrointestinal, lokal beispielsweise direkt in den Tumor, Organe oder Lymphgefäße (intranodal), aber auch subkutan, intradermal oder auf der Haut, intramuskulär. Verabreichungsarten können bevorzugterweise auch kombiniert werden, wobei sie an verschiedenen Behandlungstagen oder an einem Behandlungstag verabreicht werden können. Dabei können erfindungsgemäß auch 2 oder mehrere der erfindungsgemäßen Arzneimittel oder pharmazeutischen Zusammensetzungen kombiniert werden oder

eine oder mehrere erfindungsgemäße Arzneimittel mit ein oder mehreren Arzneimitteln oder Tumorbehandlungen, wie beispielsweise Antikörpertherapien, Chemotherapien oder Radiotherapien, die zeitlich gemeinsam oder getrennt  
5 verabreicht beziehungsweise angewandt werden. Geeignete Formulierungen, Dosierungen und Kombinationen von Komponenten sind dem Fachmann bekannt oder können durch diesen nach bekannten Methoden bestimmt werden.

10 Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels oder einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend die Schritte der Herstellung von Erkennungsmolekülen und weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle in  
15 pharmazeutisch verträglicher Form. Die hierfür bevorzugten erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle sind weiter oben als Ausführungsformen zur Behandlung von Tumorerkrankungen und Prophylaxe, sowie weiter unten unter in vivo Diagnostika näher beschrieben.

20 Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle und durch das erfindungsgemäße Verfahren hergestellten Stoffe und Zusammensetzungen können demgemäß bevorzugt zur Prophylaxe, Diagnose, Verlaufskontrolle und/oder Behandlung von  
25 Tumorerkrankungen verwendet werden. Die Verwendung der Erkennungsmoleküle, der Vektoren und/oder des Arzneimittels oder der pharmazeutischen Zusammensetzung zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Krebserkrankungen, einschließlich Tumoren und Metastasen ist weiterhin bevorzugt.

30 In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt,



prophylaktisch verhindert oder dessen Wiederauftreten verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe von Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs, der Lunge, des Mediastinums, des  
 5 Gastrointestinaltraktes, des Urogenitalsystems, des gynäkologischen Systems, der Brust, des endokrinen Systems, der Haut, Knochen- und Weichteilsarkomen, Mesotheliomen, Melanomen, Neoplasmen des zentralen Nervensystems, Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen im Kindesalter,  
 10 Lymphomen, Leukämien, paraneoplastischen Syndromen, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritonealen Karzinomastosen, Immunsuppression-bezogenen Malignitäten und/oder Tumor-Metastasen.

15 Insbesondere kann es sich bei den Tumoren um folgende Krebsarten handeln: Adenokarzinom der Brust, der Prostata und des Dickdarms; alle Formen von Lungenkrebs, der von den Bronchien ausgeht; Knochenmarkkrebs, das Melanom, das Hepatom, das Neuroblastom; das Papillom; das Apudom, das  
 20 Choristom, das Branchiom; das maligne Karzinoid-Syndrom; die Karzinoid-Herzerkrankung; das Karzinom (z.B. Walker-Karzinom, Basalzellen-Karzinom, basosquamöses Karzinom, Brown-Pearce-Karzinom, duktales Karzinom, Ehrlich-Tumor, in situ-Karzinom, Krebs-2-Karzinom, Merkel-Zellen-Karzinom,  
 25 Schleimkrebs, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Haferzellen-Karzinom, papilläres Karzinom, szirrhöses Karzinom, bronchiolo-alveoläres Karzinom, Bronchiol-Karzinom, Plattenepithelkarzinom und Transitionalzell-Karzinom); histiocytische Funktionsstörung; Leukämie (z.B.  
 30 in Zusammenhang mit B-Zellen-Leukämie, Gemischt-Zellen-Leukämie, Nullzellen-Leukämie, T-Zellen-Leukämie, chronische T-Zellen-Leukämie, HTLV-II-assoziierte Leukämie,

akut lymphozytische Leukämie, chronisch-lymphozythische Leukämie, Mastzell-Leukämie und myeloische Leukämie); maligne Histiocytose, Hodgkin-Krankheit, non-Hodgkin-Lymphom, solitärer Plasmazelltumor; Reticuloendotheliose,

5 Chondroblastom; Chondrom, Chondrosarkom; Fibrom; Fibrosarkom; Riesenzell-Tumore; Histiocytom; Lipom; Liposarkom; Leukosarkom; Mesotheliom; Myxom; Myxosarkom; Osteom; Osteosarkom; Ewing-Sarkom; Synoviom; Adenofribrom; Adenolymphom; Karzinosarkom, Chordom, Craniopharyngiom,

10 Dysgerminom, Hamartom; Mesenchymom; Mesonephrom, Myosarkom, Ameloblastom, Cementom; Odontom; Teratom; Thymom, Chorioblastom; Adenokarzinom, Adenom; Cholangiom; Cholesteatom; Cylindrom; Cystadenocarcinom, Cystadenom; Granulosazelltumor; Gynadroblastom; Hidradenom;

15 Inselzelltumor; Leydig-Zelltumor; Papillom; Sertoli-Zell-Tumor, Thekazelltumor, Leiomyom; Leiomyosarkom; Myoblastom; Myom; Myosarkom; Rhabdomyom; Rhabdomyosarkom; Ependynom; Ganglioneurom, Gliom; Medulloblastom, Meningiom; Neurilemmom; Neuroblastom; Neuroepitheliom, Neurofibrom,

20 Neurom, Paragangliom, nicht-chromaffines Paragangliom, Angiokeratom, angiolymphoide Hyperplasie mit Eosinophilie; sclerosierendes Angiom; Angiomatose; Glomangiom; Hemangioendotheliom; Hemangiom; Hemangiopericytom, Hemangiosarkom; Lymphangiom, Lymphangiomyom,

25 Lymphangiosarkom; Pinealom; Cystosarkom phyllodes; Hemangiosarkom; Lymphangiosarkom; Myxosarkom, Ovarialkarzinom; Sarkom (z.B. Ewing-Sarkom, experimentell, Kaposi-Sarkom und Mastzell-Sarkom); Neoplasmen (z.B. Knochen-Neoplasmen, Brust-Neoplasmen, Neoplasmen des

30 Verdauungssystems, colorektale Neoplasmen, Leber-Neoplasmen, Pankreas-Neoplasmen, Hirnanhang-Neoplasmen, Hoden-Neoplasmen, Orbita-Neoplasmen, Neoplasmen des Kopfes

und Halses, des Zentralnervensystems, Neoplasmen des Hörorgans, des Beckens, des Atmungstrakts und des Urogenitaltrakts); Neurofibromatose und zervikale Plattenepitheldysplasie.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt, prophylaktisch verhindert oder dessen Wiederauftreten verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe von  
 10 Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen, die Zellen umfassen, die das MUC1 in der erfindungsgemäßen Definition umfassen, ausgewählt aus der Gruppe: Tumoren des Hals-Nasen-Ohren-Bereichs umfassend Tumoren der inneren Nase, der Nasennebenhöhlen, des Nasopharynx, der Lippen, der  
 15 Mundhöhle, des Oropharynx, des Larynx, des Hypopharynx, des Ohres, der Speicheldrüsen und Paragangliome, Tumoren der Lunge umfassend nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome, kleinzellige Bronchialkarzinome, Tumoren des Mediastinums, Tumoren des Gastrointestinaltraktes umfassend Tumoren des  
 20 Ösophagus, des Magens, des Pankreas, der Leber, der Gallenblase und der Gallenwege, des Dünndarms, Kolon- und Rektumkarzinome und Analkarzinome, Urogenitaltumoren umfassend Tumoren der Nieren, der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Harnröhre, des Penis und der Hoden,  
 25 gynäkologische Tumoren umfassend Tumoren des Zervix, der Vagina, der Vulva, Korpuskarzinom, maligne Trophoblastenerkrankung, Ovarialkarzinom, Tumoren des Eileiters (Tuba Fallopii), Tumoren der Bauchhöhle, Mammakarzinome, Tumoren endokriner Organe umfassend Tumoren  
 30 der Schilddrüse, der Nebenschilddrüse, der Nebennierenrinde, endokrine Pankreastumoren, Karzinoidtumoren und Karzinoidsyndrom, multiple endokrine

Neoplasien, Knochen- und Weichteilsarkome, Mesotheliome, Hauttumoren, Melanome umfassend kutane und intraokuläre Melanome, Tumoren des zentralen Nervensystems, Tumoren im Kindesalter umfassend Retinoblastom, Wilms Tumor, 5 Neurofibromatose, Neuroblastom, Ewing-Sarkom Tumorfamilie, Rhabdomyosarkom, Lymphome umfassend Non-Hodgkin-Lymphome, kutane T-Zell-Lymphome, primäre Lymphome des zentralen Nervensystems, Morbus Hodgkin, Leukämien umfassend akute Leukämien, chronische myeloische und lymphatische 10 Leukämien, Plasmazell-Neoplasmen, myelodysplastische Syndrome, paraneoplastische Syndrome, Metastasen ohne bekannten Primärtumor (CUP-Syndrom), peritoneale Karzinomastose, Immunsuppression-bezogene Malignität umfassend AIDS-bezogene Malignitäten wie Kaposi-Sarkom, 15 AIDS-assozierte Lymphome, AIDS-assozierte Lymphome des zentralen Nervensystems, AIDS-assoziierter Morbus Hodgkin und AIDS-assoziierter anogenitale Tumoren, Transplantations-bezogene Malignitäten, metastasierte Tumoren umfassend Gehirnmastasen, Lungenmetastasen, 20 Lebermetastasen, Knochenmetastasen, pleurale und perikardiale Metastasen und maligne Aszites.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform ist die Krebserkrankung oder der Tumor, die/der behandelt, 25 prophylaktisch verhindert oder dessen Wiederauftreten verhindert wird, ausgewählt aus der Gruppe umfassend Krebserkrankungen oder Tumorerkrankungen der Mammakarzinome, der Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Dickdarmkrebs und 30 Dünndarmkrebs, der Pankreaskarzinome, der Ovarialkarzinome, Leberkarzinome, Lungenkrebs, Nierenzellkarzinome, Multiple Myelome.

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle zur Prophylaxe von Mamma- oder Ovarialkarzinomen bei Frauen mit erhöhtem  
5 Risiko für Brustkrebs eingesetzt.

Insbesondere werden in einer weiter bevorzugten Ausführungsform die Krebserkrankung, der Tumor oder Metastasierung behandelt, prophylaktisch verhindert oder  
10 dessen Wiederauftreten verhindert ausgewählt aus der Gruppe der gastrointestinalen Tumoren und dabei bevorzugt, Colonkarzinome, Magenkarzinome und rektale Karzinome.

Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle können bei der  
15 Behandlung oder Prophylaxe von Tumorerkrankungen direkt eingesetzt werden oder mit zusätzlichen Effektorstrukturen gekoppelt werden. Unter „Effektorstrukturen“ versteht man erfindungsgemäß solche chemischen oder biochemischen Verbindungen, Moleküle oder Atome, die direkt oder  
20 indirekt eine Abtötung oder Schädigung, einschließlich beispielsweise Wachstumsverlangsamung oder Wachstumsinhibition von Tumorzellen bewirken. Hierzu gehören beispielsweise Radioisotope, Toxine, Cytostatika und andere Effektormoleküle wie beispielsweise Cytokine und  
25 Chemokine oder andere Strukturen, die selbst Effektoren darstellen oder an die Effektormoleküle gekoppelt werden, beispielsweise mit Toxinen oder Cytostatika beladene Liposomen, die erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen. Beim letzteren Beispiel der Liposomen sind insbesondere  
30 auch solche Effektorstrukturen gemeint, die neben dem Erkennungsmolekül für die Tumorspezifität auch solche Moleküle tragen, die für eine Aufnahme der

Effektorstrukturen oder Teile davon in die Zellen verantwortlich sind, wie beispielsweise Antikörper gegen Rezeptoren, die eine Rezeptor-vermittelte Endozytose bewirken. Vorzugsweise umfassen die Erkennungsmoleküle in diesen Fällen eine Transmembrandomäne, die ihnen eine Insertion in die Liposomenmembran erlaubt oder in einer anderen bevorzugten Ausführungsform werden die Erkennungsmoleküle chemisch auf die Liposomenoberfläche gekoppelt. Die hierfür verwendeten Techniken sind dem Fachmann bekannt, einschließlich der Herstellung der Liposomen. Auch die Verbindung der Erkennungsmoleküle mit den anderen Effektorstrukturen erfolgt nach an sich bekannten Methoden. Die Kopplungen können dabei wie bereits oben ausgeführt beispielsweise direkt durch kovalente oder nicht-kovalente Beladung erfolgen, durch chemische Kopplung, wobei ein zusätzliches chemisches oder biologisches Molekül notwendig sein kann, beispielsweise ein Chelator oder ein Linker, oder in Form von Fusionsproteinen oder -peptiden durch Fusion. Eingesetzt werden die Erkennungsmoleküle bei der Behandlung von Tumorerkrankungen mit MUC1 tragenden Tumoren oder zur Prophylaxe, die beispielsweise die Ausbildung von primären Tumoren oder Metastasen verhindert. Bevorzugtes Ziel ist dabei die Behandlung der minimalen residualen Erkrankung und von Metastasen. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle werden dabei in einer geeigneten Formulierung einmalig oder wiederholt in geeigneten zeitlichen Abständen und Dosen verabreicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen oben beschriebenen radioaktiven Erkennungsmoleküle mit einer Applikation von nicht

markierten erfindungsgemäßen MUC1 spezifischen Erkennungsmolekülen kombiniert. Dies dient der Verbesserung des Hintergrundes und damit einer spezifischeren Bindung an den Tumor, indem die geringe Menge an MUC1 tragenden Molekülen im Blut abgesättigt werden. Bevorzugt werden dabei IgG Moleküle und weiter bevorzugt werden IgM abgeleitete Erkennungsmoleküle verwendet, beispielsweise ein cIgMG oder die humanisierte Form davon. da diese vor allem an MUC1 Antigen im Blut binden und damit den Hintergrund und die Serumbelastung mit Radioaktivität erniedrigen und das relative Tumortargeting erhöhen, während aufgrund der Größe der Moleküle ein Eindringen in Gewebe und Tumoren limitiert ist. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.

Bevorzugt ist weiterhin die Verwendung von viralen Vektoren zur gentherapeutischen Anwendung, bei der insbesondere die Oberfläche der Viren erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle tragen.

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums umfassend die Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Herstellung der erfindungsgemäßen MUC11 spezifischen Erkennungsmoleküle und weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der Erkennungsmoleküle in einer diagnostisch verwendbaren Form.

Unter dem Begriff "Diagnostikum" sind erfindungsgemäß Stoffe und Zubereitungen aus Stoffen definiert, die dazu

bestimmt sind, durch Anwendung am oder im menschlichen Körper oder Teilen davon Krankheiten, Leiden, Körperschäden oder krankhafte Beschwerden zu erkennen. Als Teile des menschlichen Körpers sind vorzugsweise Körperflüssigkeiten, wie Blut, Blutserum, Lymphe, Urin, Spinalflüssigkeit oder Sperma, oder Gewebebiopsien oder -proben zu verstehen.

Die Formulierung des Diagnostikums umfasst vorzugsweise die Modifikation der hergestellten Erkennungsmoleküle mit Substanzen, die einen Nachweis des Antigens MUC1 erlauben. Geeignete Substanzen sind im Stand der Technik bekannt. Ausgehend von der Wahl der Substanz ist der Fachmann in der Lage, geeignete Maßnahmen zur Formulierung des Diagnostikums einzusetzen.

Für die Diagnostik können erfindungsgemäß auch Substanzen nach an sich bekannten Methoden an die Erkennungsmoleküle gekoppelt werden, die einen Nachweis des MUC1 Antigens und/oder deren Trägerzellen erleichtern, beispielsweise durch Biotinylierung, Fluoreszenzmarkierung, radioaktive Markierung oder Enzymkopplung der Erkennungsmoleküle.

In einem weiteren Verfahren zur Tumordiagnostik und Prognose werden erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle verwendet, die MUC1 Antigene im Serum von Menschen erkennen. Dies ist auch vor dem Hintergrund der Eigenschaft der Erkennungsmoleküle, dass sie im Vergleich zu den bekannten Antikörpern HMFG-1 und DF-3 (CA15-3 Test) viel weniger MUC1 im Serum binden möglich und vorteilhaft, da die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle deutlich zwischen Normalseren und Tumorseren unterscheiden können, auch dann wenn die Bindung in Colontumorpatientenseren gering ist.



Die Bestimmung erfolgt bevorzugt qualitativ, quantitativ und/oder in zeitlich relativen Quantitäten nach an sich bekannten Methoden. Die gleichen Verfahren werden erfindungsgemäß auch zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen und zur Kontrolle von Behandlungsverläufen einschließlich des Monitorings von Immunantworten und zur Kontrolle und Dosierung von Tumorbehandlungen eingesetzt. Die in den Verfahren verwendeten Methoden sind an sich bekannt, beispielsweise

5 ELISA, Westerblot, FACS (Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung), MACS (Magnetvermittelte Zellsortierung), ADCC (Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität), CDC (Komplement vermittelte Zytotoxizität), Immuncytochemie und Immunhistochemie.

15

In den bevorzugten erfindungsgemäßen Verfahren zur Tumordiagnostik und Prognose werden erfindungsgemäße MUC1 spezifische Erkennungsmoleküle in an sich bekannten Verfahren eingesetzt, um das Antigen glykosylierte MUC1-Tumorepitop im Serum oder in Gewebspräparaten nachzuweisen. Dabei wird das Antigen MUC1, in Immunkomplexen vorliegendes MUC1 und/oder auf Zellen gebundenes MUC1 nachgewiesen und das Vorhandensein des MUC1 Antigens qualitativ, quantitativ und/oder in relativen Quantitäten nach an sich bekannten

20 Methoden bestimmt. Die gleichen Verfahren werden erfindungsgemäß auch zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen und zur Kontrolle von Behandlungsverläufen eingesetzt. Die in den Verfahren verwendeten Methoden sind an sich bekannt, beispielsweise ELISA, Western-Blot, FACS (Fluoreszenz-

30 aktivierte Zellsortierung), MACS (Magnetvermittelte Zellsortierung), ADCC (Antikörpervermittelte Zellzytotoxizität), CDC (Komplement vermittelte

Zytotoxizität), Immuncytochemie und Immunhistochemie.

Eine bevorzugte Ausführungsform ist ein Gewebsschnelltest, bei dem in einem immunhistologischen Verfahren die Gewebeproben mit fluoreszenzmarkierten erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen gefärbt werden. In einem weiter bevorzugten Verfahren wird das erfindungsgemäße Erkennungsmolekül, bevorzugt ein Antikörper des Isotyps IgG, mit einem weiteren Antikörper, der spezifisch das Antigen Core-1 erkennt, bevorzugt Isotyp IgM, kombiniert. Der Vorteil dabei ist, dass beispielsweise für die Diagnostik von gastrointestinalen Karzinomen (z.B. Colorektale Karzinome und Magenkarzinome) diese in einem frühen Stadium erkannt und gleichzeitig eine Prognose bezüglich des Krankheitsverlaufes und/oder der Lebermetastasierungsgefahr gegeben werden kann, wobei ein höheres Niveau an Core-1 und MUC1 Antigen eine schlechtere Verlaufsprognose und ein höheres Niveau an Core-1 eine um das mehrfach höhere Wahrscheinlichkeit der Lebermetastasierung bedeutet. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper und Erkennungsmoleküle direkt mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, beispielsweise Cy3 und Cy5 oder Cy3 und FITC, markiert. In einer Ausführungsform, in der eine Signalverstärkung vorteilhaft ist, werden die Antikörper und/oder Erkennungsmoleküle durch markierte sekundäre Antikörper oder das Biotin-Streptavidin verstärkt. Dabei ist es vorteilhaft, unterschiedliche Isotypen und/oder Speziessequenzen im konstanten Teil der Antikörper zu verwenden. Die hierbei verwendeten Technologien und Methoden, beispielsweise der Markierung und der Immunhistologie, sowohl die Wahl der geeigneten Formate der

Erkennungsmoleküle sind dem Fachmann bekannt. Das beschriebene diagnostische Verfahren ist nicht auf gastrointestinale Tumoren beschränkt, sondern anwendbar für alle das Antigen MUC1 tragende Tumorerkrankungen.

5

In einer weiter bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden für einen serologischen Tumortest die Bestimmung des MUC1 Antigens, wie zuvor beschrieben, mit der Bestimmung anderer serologischer Tumormarker kombiniert,

10

beispielsweise PSA, CEA oder AFP. Eine hierbei bevorzugte Ausführungsform ist die Bestimmung des MUC1 und des Core-1 Antigens. In einer bevorzugten Ausführungsform wird hierbei das MUC1 mit Hilfe eines MUC1 spezifischen Antikörpers aus dem Serum an eine feste Phase immobilisiert und mit einem

15

erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül, das das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet, als Nachweisantikörper nachgewiesen und das Core-1 Antigen auf dem mit Hilfe eines anti-MUC1 Fängerantikörpers wie die erfindungsgemäßen MUC1 spezifischen Erkennungsmoleküle immobilisierten MUC1 mit

20

einem spezifischen anti-Core-1 Antikörper nachgewiesen. Dieser diagnostische Test verbindet eine Früherkennung mit einer prognostischen Aussage über den Krankheitsverlauf und/oder der Lebermetastasierungswahrscheinlichkeit. Die

25

hierbei verwendeten Technologien, beispielsweise der Markierung und der Serologie, einschließlich der Nachweismethoden, sind dem Fachmann bekannt. Die

30

beschriebenen diagnostischen Verfahren sind nicht auf gastrointestinale Tumoren beschränkt, sondern anwendbar für alle das Antigen MUC1 tragende Tumoren. Die beschriebenen serologischen Tests dienen der Diagnose, des Monitorings des Verlaufs der Tumorerkrankung und der Prognose von MUC1-positiven Tumoren.

In einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren werden die erfindungsgemäßen MUC1-spezifischen Erkennungsmoleküle zu einer in vivo Diagnostik verwendet. Hierfür werden die

5 Erkennungsmoleküle mit geeigneten an sich bekannten Verfahren markiert und somit für an sich bekannte bildgebende Verfahren am Menschen zugänglich gemacht, beispielsweise Radioimmundiagnostik, PET-Scan Verfahren oder Immunofluoreszenzendoskopie, beispielsweise durch

10 Kopplung und/oder Beladung mit entsprechenden Molekülen, beispielsweise radioaktiven Isotope, beispielsweise das Indium, oder Fluoreszenzfarbstoffe, beispielsweise dem Cy3, Cy2, Cy5 oder FITC. In einer bevorzugten Ausführungsform werden erfindungsgemäße Multibodies mit einem geeigneten

15 Chelator (beispielsweise DOTA oder DTPA) kovalent gekoppelt und mit Indium-111 beladen und zur in vivo Diagnostik eingesetzt. Diese werden in einer bevorzugten Ausführungsform intravenös in einer für das Individuum geeigneten Dosis verabreicht und die Lokalisation des MUC1

20 Antigens und eines potentiellen Tumors nach an sich bekannten Verfahren gemessen. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien, einschließlich der bildgebenden Verfahren, sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis und Formulierungen erstellen.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Immunglobuline, bevorzugt IgG, wie oben beschrieben und in den Beispielen näher ausgeführt, radioaktiv-markiert, beispielsweise mit Indium-111, und lokal in den Tumor oder

30 in den Tumor versorgende oder entsorgende Blutgefäße gegeben. Dies dient in einer Ausführungsform zur Bestimmung der Größe des Tumors und in einer weiteren Ausführungsform

der Bestimmung befallener Lymphknoten. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis und Formulierungen erstellen.

5

In einer weiteren Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen radioaktiv-markierten Erkennungsmoleküle auch über andere Applikationsrouten verabreicht. Dabei bevorzugte Routen sind intraperitoneal, intranodal oder intrarectal bzw. intragastrointestinal. Intraperitoneal ist dabei besonders vorteilhaft zur Bestimmung von Tumoren, die über das Peritoneum zugänglich sind und/oder in dieses metastasieren, beispielsweise Ovarialkarzinome und bestimmte gastrointestinale Karzinome. Intrarectale bzw. intragastrointestinale Verabreichung ist vorteilhaft für bestimmte gastrointestinale Tumoren und deren Lokalisation und Größenbestimmung. Intranodal kann in bestimmten Fällen dafür verwendet werden einzelne Lymphknoten direkt zu infiltrieren.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen oben beschriebenen radioaktiven Erkennungsmoleküle für in vivo Diagnostika mit einer Applikation von nicht markierten erfindungsgemäßen MUC1 spezifischen Erkennungsmolekülen kombiniert. Dies dient der Verbesserung des Hintergrundes. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien sind dem Fachmann bekannt, ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.

30

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden

erfindungsgemäße Erkennungsmoleküle, bevorzugt Immunglobuline, Multibodies oder Antikörperfragmente, weiter bevorzugt IgG, Fab und Multibodies, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und in vivo verabreicht.

5 Bevorzugte Applikationsrouten sind hierbei intrarectal, intragastrointestinal, intraperitoneal, intravenös und in zuführende oder abführende Blutgefäße. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform dient der Lokalisation gastrointestinaler Karzinome, die durch eine Fluoreszenz-

10 endoskopie nach Applikation der fluoreszenzmarkierten Erkennungsmoleküle durchgeführt wird. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform wird ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül mit mindestens einem Antikörper gegen ein weiteres Tumorantigen kombiniert, bevorzugt anti-Core-1

15 Antikörper. Bevorzugt werden dabei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die eine Unterscheidung der Erkennungsmoleküle und Antikörper erlauben, womit eine prognostische Aussage mit einer Früherkennung und einer größeren Anzahl an Fällen kombiniert wird. Bevorzugte

20 Fluoreszenzfarbstoffe sind solche mit geringer Hintergrundfluoreszenz, die dem Fachmann bekannt sind. Die hierfür verwendeten Verfahren und Technologien, einschließlich der bildgebenden Verfahren, beispielsweise der Fluoreszenz-Endoskopie, sind dem Fachmann bekannt,

25 ebenfalls kann der Fachmann eine geeignete Dosis, Formulierungen, Applikationsroute und Zeitpunkt der Gabe der nicht-markierten Erkennungsmoleküle erstellen.

Die Erfindung weist mehrere Vorteile auf: Die

30 erfindungsgemäßen MUC1 spezifischen Erkennungsmoleküle erkennen Tumorarten spezifisch, wodurch sie mit Vorteil bei vielen Tumorpatienten verschiedener Indikation zu einer

Diagnose und/oder Therapie verwendet werden können. Darüber hinaus binden die Erkennungsmoleküle vorteilhafterweise sehr gering auf oder an in vivo nicht zugänglichen Bereichen im normalen Gewebe. Dies ist gegenüber den bekannten Tumormarkern Antikörpern ein besonderer Vorteil und eine herausragende Eigenschaft der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle. Ein besonderer Vorteil der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle ist die hohe Spezifität für das Tumorgewebe. Dies ist insbesondere in der hohen Spezifität für ein definiertes glykosyliertes MUC1-Tumorepitop begründet. Das polymorphe epitheliale Mucin MUC1 ist als Gesamtmolekül ein anerkannter Tumormarker. Aufgrund der Komplexität des Moleküls, das sehr groß ist, stark glykosyliert ist, extrazellulär im wesentlichen aus einer großen polymorphen Anzahl von Tandem Repeats aus 20 Aminosäureresten besteht und bezüglich der Tandem Repeats heterogen glykosyliert ist, besitzt MUC1 eine Vielzahl von Epitopen. Die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle, die spezifisch das glykosylierte MUC1-Tumorepitop im Sinne der Erfindung spezifisch binden, detektieren ein definiertes Epitop im MUC1, was eine hohe Spezifität der Erkennungsmoleküle für Tumorgewebe zur Folge hat. Besonders vorteilhaft ist weiterhin, dass die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle nur im geringen Maß solches MUC1 erkennen, das von Tumorzellen in das Serum abgegeben wird (Shedding). Diese reduzierte Bindung an im Serum vorliegendes MUC1 im Tumorpatienten ist ein großer Vorteil in der Therapie von Tumorerkrankungen mit den erfindungsgemäßen Erkennungsmolekülen. Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle eine hohe Affinität auf. Hierdurch ist insbesondere die Möglichkeit gegeben, geringervalente Fragmente zu konstruieren, wie scFv und

Multibodies. Die Möglichkeit dieser verschiedenen Formate ist vorteilhaft für die Entwicklung von Therapeutika.

Im Folgenden soll die Erfindung anhand von Beispielen näher  
5 erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

### Beispiele

10

1. Herstellung von scFv mit verschiedenen Linkerlängen, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

15 MUC1 spezifische scFv mit den Sequenzen SEQ ID NO. 36 bis 59 wurden durch PCR Amplifizierung und anschließender Klonierung der variablen Ketten in einen bakteriellen Expressionsvektor hergestellt. Dieser Vektor enthält den lacZ Promotor, eine Ribosomenbindungsstelle (RBS), das M13  
20 origin, die pelB Signalsequenz zur Sekretion ins Periplasma, ein Ampicillin-Resistenzgen und eine Klonierungskassette, um an das C-terminale Ende des scFv ein Hexa-Histidin-Tag zur effizienten Aufreinigung und ein c-myc-Tag zu koppeln (Abb. 1). Für die verschiedenen  
25 Linkerlängen wurden die  $V_H$  und die  $V_L$  mit spezifischen Primern so amplifiziert, daß 22 Nukleotide am 3'-Ende der  $V_H$  und am 5'-Ende der  $V_L$  einen komplementären Bereich ausbilden (Abb. 2, PCR I und PCR II). Anschließend wurden die beiden PCR-Fragmente nach Aufreinigung in einer SOE-PCR  
30 miteinander verknüpft (Abb. 2, PCR III) und das PCR-Fragment über NcoI/NotI in den oben beschriebenen Vektor kloniert.



## 2. Bakterielle Expression und Aufreinigung der scFv, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

5

Die Antikörperfragmente aus Beispiel 1 wurden in *Escherichia coli* exprimiert und aufgereinigt. Hierfür wurde das entsprechende Plasmid durch Elektroporation in elektrokompente *E.coli* transformiert und über Nacht in 2xTY Medium (10 g Hefeextrakt, 16 g Trypton, 5 g NaCl per L) mit 100 µg/mL Ampicillin kultiviert. Diese Kultur wurde 1:100 mit 2xTY Medium, dem 100 µg/ml Ampicillin und 0,5% Glukose zugesetzt wurde, verdünnt und bei 37°C inkubiert, bis eine OD<sub>600 nm</sub> von ca. 0,6 erreicht war. Dann wurde der Kultur zur Induktion 1 mM IPTG zugesetzt und diese bei 25°C weitere 5 h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000xg für 20 min geerntet, das Zellpellet in TES Puffer (30 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20% Saccharose, 1 mM EDTA) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 5 mM MgSO<sub>4</sub> zugefügt und die Suspension für weitere 20 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 4000 x g für 60 min wurde dann die Periplasmafraktion gewonnen und über Nacht bei 4°C gegen Bindungspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) dialysiert. Die in der Periplasmafraktion enthaltenen Antikörperfragmente wurden unter Verwendung des C-terminalen His-Tags durch Metallionen-Affinitätschromatographie (HiTrap Chelating HP, Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt. Dafür wurde die dialysierte Fraktion auf die vorher mit Bindungspuffer äquilibrierte Säule gegeben und mit Waschpuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol) die

10  
15  
20  
25  
30

nicht bindenden Proteine von der Säule gewaschen. Anschließend wurden die Antikörperfragmente mit Elutionspuffer (50 mM Phosphatpuffer, pH 8.0, 300 mM NaCl, 300 mM Imidazol) eluiert.

5

### 3. Klonierung der Vektoren zur Expression chimärer IgG und IgM Antikörper, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

10

Das NcoI/XhoI DNA Fragment aus dem scFv Vektor, das für die  $V_H$  kodiert (Abb. 1), wurde in den NcoI/SalI geschnittenen BS-Leader Vektor kloniert (Abb. 3). Der BS-Leader Vektor enthält eine Klonierungskassette zur Einführung der T-Zellrezeptor Signalpeptidsequenz an das 5'-Ende sowie einer

15

Splice-Donor-Sequenz an das 3'-Ende der Sequenzen der variablen Domänen (Abb. 3). Die  $V_L$ -Sequenz des

entsprechenden Antikörpers wurde mit spezifischen Primern

zur Einführung der NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende und der

20

NheI-Schnittstelle am 3'-Ende in der PCR unter Verwendung der scFv Sequenz als Templat amplifiziert und nach

NcoI/NheI Verdau in den gleich verdauten BS-Leader Vektor kloniert. Danach wurde jeweils das HindIII/BamHI Fragment

aus dem BS-Leader Vektor in den entsprechenden

25

eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Diese Vektoren

(pEFpuroC $\gamma$ 1V $_H$ , pEFpuroC $\mu$ V $_H$  und pEFneoCkV $_L$ ) enthalten den EF-

1 $\alpha$ -Promotor und den HCMV-Enhancer, das SV40-origin, das

BGH-Polyadenylierungssignal, das Puromycin-Resistenzgen im

Vektor für die schwere Kette und das Neomycin-Resistenzgen

30

im Vektor für die leichte Kette sowie die genomischen

Sequenzen der humanen konstanten  $\gamma$ 1 Region oder  $\mu$  Region

für die schwere Kette bzw. der humanen konstanten  $\kappa$  Region

für die leichte Kette (Primer zur Amplifizierung aus genomischer humaner DNA und Vektorkarte siehe Abb. 3).

5    4.    **Eukaryontische Expression chimärer IgG und IgM  
Antikörper, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop  
spezifisch erkennen, in CHO Zellen und deren  
Aufreinigung**

10    Zur Expression der chimären Antikörper cIgG-Panko1  
bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 64 und 68, cIgG-  
Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 65 und 69,  
cIgM-Panko1 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO. 66 und  
68 und cIgM-Panko2 bestehend aus den Sequenzen SEQ ID NO.  
15    67 und 69 wurden CHOdhfr- Zellen (ATCC-NO. CRL-9096) mit  
einem Gemisch der Vektoren für die schwere und die leichte  
Kette (1:3) durch Elektroporation ( $10^6$  Zellen/ml, 500 V, 50  
 $\mu$ s) cotransfiziert und in Selektionsmedium (CHO-S-SFM II  
Medium (Life Technologies), HT Supplement (Biochrom), 400  
20     $\mu$ g/ml G418, 5  $\mu$ g/ml Puromycin) 2 Wochen kultiviert. Nach  
Einzelzellklonierung in einer 96-Loch-Platte wurden die  
Überstände im ELISA (glykosyliertes MUC1 Peptid (30-mer,  
siehe unten) als Antigen, anti human Fc $\gamma$ 1- POD gekoppelt  
bzw. anti human Fc $\gamma$ 5 $\mu$ - POD gekoppelt (Dianova) als  
25    Sekundärantikörper) getestet und der Klon mit der höchsten  
Antikörperproduktionsrate selektioniert (ca. 0,5  $\mu$ g/ $10^6$   
Zellen/24 h).

30    Zur Antikörperproduktion wurden die stabil transfizierten,  
die chimären IgG bzw. IgM sekretierenden CHO Zellen in  
Spinnerflaschen oder Flaschenkultur in CHO-S-SFM II Medium,  
ergänzt durch HT Supplement, kultiviert, bis eine

Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml erreicht war. Nach Abtrennung der Zellen vom Zellkulturüberstand durch Zentrifugation (400xg, 15 min) wurde der chimäre Antikörper unter Verwendung einer Protein A - Säule (HiTrap rProtein A FF, Amersham Pharmacia Biotech) für die chimären IgG bzw. 5 einer anti human Fc $\gamma$ 2b-Antikörper-Affinitätssäule für den chimären IgM aufgereinigt. Die durch pH-Sprung eluierte gereinigte Antikörperfraktion wurde unter Verwendung von Centriprep-Zentrifugenröhrchen (cut off 50 kDa, Millipore) 10 in PBS umgepuffert und aufkonzentriert.

#### 5. Analyse der scFv und Antikörper, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen, im ELISA

15

Als Antigene wurden verschiedene synthetische Peptide und Glykopeptide verwendet: ein nicht-glykosyliertes 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS; ein glykosyliertes 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS; 20 APPAHGVTSAPDT[GalNAc $\alpha$ ]RPAPGSTAPPAHGVTS, eine Serie von nicht-glykosylierten MUC1-Peptiden unterschiedlicher Länge der Sequenz [VTSAPDTRPAPGSTAPPAH] $_n$ , wobei  $n = 1, 3$  und  $5$  (TR1, TR3 und TR5) ist, und eine Serie von glykosylierten MUC1-Peptiden unterschiedlicher Länge der Sequenz 25 A[HGVTSAPDT(GalNAc $\alpha$ )RPAPGSTAPPA] $_n$ , wobei  $n = 1, 3$  und  $5$  (TR1g, TR3g und TR5g) ist.

Aus den jeweiligen Stammlösungen (1 mg in 1ml Bi-dist. H<sub>2</sub>O), die portioniert bei -20°C aufbewahrt werden, wurde 30 eine Verdünnung von 1  $\mu$ g/ml in PBS oder 10  $\mu$ g/ml in Bi-dist. hergestellt. Davon wurden 50  $\mu$ l/well in eine Mikrotiterplatte pipettiert und die Testplatte über Nacht

inkubiert (für Peptide in PBS Verwendung von NUNC - Immuno plate F96 MAXISORP und Inkubation bei 4°C; für Peptide in Bi-dest Verwendung von Nunclon - TC plates und Antrocknung der Peptide bei 37°C). Am nächsten Tag wurde die Testplatte mit PBS/0,2% Tween20 3x gewaschen. Anschließend wurden mit 2% BSA in PBS unspezifische Bindungsstellen blockiert und 50 µl des ersten Antikörpers aufgetragen (murine Antikörper: 10 - 10000 ng/ml PBS/1% BSA; chimärer IgG: 1 - 100 ng/ml in PBS/1% BSA; scFv: 50 - 500 ng/ml in PBS/1% BSA). Nach drei Waschschritten mit PBS/0,2% Tween20 wurden zum Nachweis der spezifisch gebundenen Antikörperkonstrukte die entsprechenden Zweit-Antikörper, Peroxidase-gekoppelt, eingesetzt (ein anti-Maus bzw. anti-human Fcγ1 für die ganzen Antikörper, ein anti-His Tag-Antikörper für scFv). Zum Nachweis des gebundenen sekundären Antikörpers erfolgte eine Farbreaktion mit TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine). Nach ca. 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Die Messung erfolgte mit einem Mikrotiterplattenphotometer mit Filter 450nm im Dual-mode gegen einen Referenzfilter 630nm. Repräsentative Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 bis 8 dargestellt.

#### 5.1. Bindung an die glykosylierte PDTRP Region innerhalb einer MUC1 Tandem Repeat Sequenz

Abbildung 4 zeigt die Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle bevorzugt an das glykosylierte MUC1 Peptid. Es sind zwei Erkennungsmoleküle mit variierenden Loop-Sequenzen im IgG-Format verglichen. Die Antikörperkonstrukte mIgG-Panko1 (SEQ ID NO. 60 und SEQ ID NO. 62) und mIgG-Panko2 (SEQ ID NO. 61 und SEQ ID NO.

63) binden hochspezifisch an das 30-mer, bevorzugt an das glykosylierte Peptid und nur schwach oder gar nicht an die nicht-glykosylierte Peptidsequenz. Im Vergleich zu mIgG-Panko1 und mIgG-Panko2 ist in Abbildung 5 die Bindung der MUC1-spezifischen Antikörper HMFG-1, C595 und SM3 an das nicht-glykosylierte und das glykosylierte 30-mer dargestellt (repräsentatives Beispiel). Die drei Antikörper HMFG-1, C595 und SM3 zeigen keine oder nur eine schwache Glykosylierungsabhängigkeit mit einem Faktor (Verhältnis glykosyliertes/nicht-glykosyliertes Peptid) für alle drei Antikörper von  $< 1,2$ . Die Antikörper dienen zur Abgrenzung und sind nicht Teil der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle. Dagegen ergibt sich unter gleichen Bedingungen für den mIgG-Panko1 ein Faktor von  $> 4,5$  (in Abb. 5: 5,1) und für den mIgG-Panko2 ein Faktor von  $> 20$  (in Abb. 5: 22,1).

In Abbildung 6 sind verschiedene Formate der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle in ihrer spezifischen Bindung bevorzugt an das glykosylierte MUC1-Peptid dargestellt.

## 5.2. Bindung an multiple nicht-glykosylierte MUC1 Tandem Repeats

Abbildung 7 zeigt als repräsentatives Beispiel die Bindungsabhängigkeit der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle mIgG-Panko1 und mIgG-Panko2 von der Anzahl der nicht-glykosylierten Tandem Repeats im Vergleich zu den MUC1-spezifischen Antikörpern C595 und SM3. Das Verhältnis des Signals mit dem TR5 Peptid zu dem mit dem TR1 Peptid stellt einen Faktor dar, der den

Grad der Bindungsabhängigkeit von der Anzahl der Repeats widerspiegelt. Für den mIgG-Panko1 und den mIgG-Panko2 ergeben sich Faktoren von  $> 3$  (in Abb. 7: 3,9) bzw.  $> 8$  (in Abb. 7: 12,7), wohingegen die MUC1-spezifischen Antikörper unter gleichen Bedingungen C595 (Faktor 1,1) und SM3 (Faktor 2,1) keine oder nur eine geringe Abhängigkeit zeigen.

### 5.3. Bindung an multiple glykosylierte MUC1 Tandem Repeats

Abbildung 8 zeigt als repräsentatives Beispiel die Bindungsabhängigkeit des erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls mIgG-Panko2 von der Anzahl der Tandem Repeats (multiple glykosylierte PDTR-Regionen) im Vergleich zu den MUC1-spezifischen Antikörpern C595 und SM3. Der mIgG-Panko2 zeigt eine zusätzliche Abhängigkeit von der Anzahl glykosylierter Tandem Repeats, wohingegen die Bindung der MUC1-spezifischen Antikörper C595 und SM3 unabhängig von einer Erhöhung der Repeat-Anzahl ist.

### 6. Immunhistologische und immunzytologische Färbungen mit Erkennungsmolekülen, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

Für die immunhistologischen Färbungen wurden Gefrierschnitte entsprechender Gewebeproben luftgetrocknet und mit 10% Formaldehyd in PBS 15 min fixiert. Zur Reduktion der endogenen Peroxidase-Aktivität wurden die Schnitte mit 3% Wasserstoffperoxid in PBS behandelt und nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit

Kaninchenserum mit einem erfindungsgemäßen MUC1-spezifischen Erkennungsmolekül in Form eines Primärantikörpers inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (anti-Maus IgG POD gekoppelt) inkubiert. Die Farbreaktion erfolgte unter Verwendung des Peroxidase-Substrats Diaminobenzidin und die Gegenfärbung mit Hämatoxylin.

Das beispielhafte erfindungsgemäße Erkennungsmolekül mIgG-Panko2 reagiert nur mit wenigen Strukturen im Normalgewebe. Diese befinden sich hauptsächlich in immunprivilegierten Regionen des Körpers, beispielsweise auf der apikalen Oberfläche von Zellen bestimmter Drüsengänge, und sind somit in für einen Antikörper in vivo nicht oder nur sehr schlecht zugänglichen Bereichen (Tabelle 3). Darüber hinaus sind die Färbungen im normalen Brustgewebe im Vergleich zum Tumorgewebe schwach und befinden sich nur an der apikalen Membran.

**Tabelle 3:** Reaktion von humanem Normalgewebe mit dem MUC1 spezifischen Antikörper mIgG-Panko2.

	Gewebetyp	Reaktivität
	Epidermis	
25	Stratum basale	+/-
	Stratum spinosum	-
	Stratum granulosum	-
	Stratum corneum	-
	nicht epidermale Zellen	-
30	Magen	
	Foveola Epithelium	-
	Fundusdrüsen	-



	Korpusdrüsen	-
	Dünndarm	
	Mucosa	-
	Colon	
5	Mucosa	-
	Brust	
	Drüsengänge	+
	Azini	+
	myoepitheliale Zellen	-
10	Milz	
	Trabeculae lienis	-
	Retikularzellen	-
	Lymphozyten	-
	Makrophagen	-
15	Endothelium	-
	Prostata	+
	Leber	
	Hepatozyten	-
	Gallenwege	+
20	Niere	
	Glomeruli	-
	Kapselepitheium	-
	Tubuli proximales	-
	Tubuli distalis	-/+
25	Sammelrohr	-/+
	Lymphknoten	
	Lymphozyten	-
	Makrophagen	-
	Retikularzellen	-
30	Gallenblase	
	Mucosa	+
	Gehirn	

	Neuronen	-
	Gliazellen	-
	Meninges	-
	Ependymzellen	-
5	Nebenniere	
	Nebennierenrinde	-
	Nebennierenmark	-
	Thymus	
	Epitheliale Retikularzellen	-
10	Hassall-Körperchen	-/+
	Lymphozyten	-
	Makrophagen	-
	Blase	
	Urothelium	+
15	Herz	
	Endocardium	-
	Myocardium	-
	Mesothelium	-
	Bauchspeicheldrüse	
20	Drüsengänge	+
	Azini	+
	Langerhans'sche Inseln	-
	Bindegewebe	-
	Synovialgewebe	-
25	Muskelgewebe	
	glatter Muskel	-
	Skelettmuskel	-

Die beanspruchten Erkennungsmoleküle reagieren positiv mit  
 30 einer Vielzahl von Tumoren. Die Daten in Tabelle 4 zeigen,  
 dass die MUC1 spezifischen Erkennungsmoleküle einen großen  
 Prozentsatz an Tumorpatienten einer Indikation erkennen,

der von Indikation zu Indikation unterschiedlich ist. In Dickdarmadenomen korreliert die Färbung mit dem Grad der Dysplasie. Colonadenome reagieren nicht oder nur sehr schwach mit mIgG-Panko2, wohingegen Colonkarzinome positiv sind. Normales Pankreasgewebe ist nur schwach positiv, Pankreaskarzinome zeigen dagegen eine sehr starke Reaktion mit dem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül mIgG-Panko2.

Tabelle 4: Reaktion von humanem Tumorgewebe mit mIgG-Panko2.

	Gewebetyp	% positive Fälle
	Colon	
	Adenome	
15	tubulär	25
	tubulär-villös	25
	villös	33
	Transitorische Mucosa	30
	Karzinome	
20	Adenokarzinom	90
	Papilläres Adenokarzinom	67
	Muköses Adenokarzinom	67
	Muzin-produzierendes Adenokarzinom	100
25	Siegelringzellkarzinom	100
	Lebermetastasen	81
	Magenkarzinome	90
	Leberkarzinome	
	gut differenziert	14
30	mäßig differenziert	42
	schwach differenziert	50
	Pankreaskarzinome	100

## Mammakarzinome

Primärkarzinome	87
Metastasen	91
Nierenzellkarzinome	100

5

Für die immunzytologischen Färbungen wurde die Immunfluoreszenz eingesetzt. Dafür wurden die entsprechenden Zellen auf Objektträger angetrocknet und mit 5% Formaldehyd 10 min fixiert. Nach Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit BSA (1% in PBS) wurden die Zellen mit dem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül in Form von Primärantikörpern inkubiert. Anschließend wurde 3 mal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG-FITC oder anti-human Fab-Cy2, Dianova) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Mowiol eingebettet.

20 Es wurden verschiedene Zelllinien mit MUC1 spezifischen Erkennungsmolekülen in der Immunfluoreszenz getestet. Eine Reihe von Tumorzelllinien reagieren positiv (Tab. 5 und die Abb. 9 und 10).

25 **Tabelle 5:** Reaktivität verschiedener Zelllinien mit dem MUC1 spezifischen Antikörper mIgG-Panko2.

Zelllinien	Reaktivität
ZR-75-1	Positiv
T47D	Positiv
U266	(positiv) 5
LN78	Positiv
HT29	Negativ
HCT15	(positiv)
HepG2	Negativ
K562	Positiv 10
MCF-7	Positiv
HEK293	(positiv)

15

Abbildung 9 zeigt beispielhaft eine Fluoreszenzmarkierung von T47D Zellen, einer Mammakarzinom-Zelllinie, mit mIgG-Panko2. Abbildung 10 zeigt beispielhaft eine Fluoreszenzmarkierung von K562 Zellen mit cIgG-Panko1.

20

Mit Hilfe der Immunhistologie und der Immunfluoreszenzmarkierung wurde ebenfalls die Neuraminidase-abhängigkeit des glykosylierten MUC1-Tumorepitops untersucht. Hierfür wurden die Schnitte bzw. die Zellen mit Neuraminidase (0,02 U/ml PBS + 0,01 M  $\text{Ca}^{2+}$ ) eine Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert, anschließend mit PBS gewaschen und dann wie oben markiert. Wie in den Tabellen 6 und 7 dargestellt ist die Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle an das glykosylierte MUC1-Tumorepitop im Sinne der Erfindung Neuraminidase-unabhängig oder wird durch Neuraminidasebehandlung verstärkt.

**Tabelle 6:** Immunhistologische Färbungen von humanem Gewebe mit dem mIgG-Panko2 vor und nach Neuraminidase-Behandlung.

5

	Reaktivität unbehandelt	Reaktivität nach Neuraminidase- behandlung
normales Colongewebe	-	-
Colonadenome	+	+
Colonkarzinome	++	++
Mammakarzinome	++	+++

**Tabelle 7:** Immunfluoreszenzmarkierung von zwei Tumorzelllinien mit dem mIgG-Panko2 vor und nach Neuraminidase-Behandlung.

10

	Reaktivität unbehandelt	Reaktivität nach Neuraminidase- behandlung
K562	+	++
ZR-75-1	+++	++++

**7. Chelatisierung und radioaktive Markierung von Antikörpern und Antikörperfragmenten, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen**

15

Durch Konjugation wurde an die Antikörper mIgG-Panko2 und cIgG-Panko1 bzw. an die scFv-Formate mit den Sequenzen SEQ ID NO. 36 und 45 ein Chelator kovalent gebunden, der die Bindung eines Radiometalls ermöglicht. Als Chelatoren kamen

20

die kommerziellen Produkte der Firma Macrocyclics (Dallas, USA), p-isothiocyanatobenzyl-diethylenetriaminepentaacetic acid (p-SCN-Bz-DTPA) und p-isothiocyanatobenzyl -1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (p-SCN-Bz-DOTA) zum Einsatz. Beide Chelatoren eignen sich zur  
5 Kopplung an Antikörper zu deren Radioaktivmarkierung [Brechbiel et al., 1986; Kozak et al., 1989; Stimmel et al., 1995].

10 Die Konjugation erfolgte durch Reaktion der Isothiocyanatgruppe des Chelators mit einer freien ε-Aminogruppe der Aminosäure Lysin am Antikörper. Es entsteht eine kovalente N-C-Bindung zwischen Chelator und Antikörper.

15 Der gereinigte Antikörper bzw. das gereinigte Antikörperfragment muß zunächst in Kopplungspuffer pH 8,7 umgepuffert werden. Hierzu wurde eine Ultrafiltration in einer Filtrationshülse (Centriprep YM-50 bzw. YM-10;  
20 Millipore) durchgeführt. Dies erfolgte durch mehrmalige Verdünnung mit 10-fachem Volumen und Filtration durch eine Membran mit definierter Porengröße durch Zentrifugation. Dadurch wurde PBS durch den alkalischen Kopplungspuffer (0,05 M Natrium-Carbonat, 0,15 M Natriumchlorid, pH 8,7)  
25 ersetzt.

Die Chelatisierung wurde mit den bifunktionellen Chelatoren p-SCN-Bz-DTPA- bzw. p-SCN-Bz-DOTA durchgeführt. Zur Chelatisierungsreaktion wurden Protein (1-10 mg/ml) in  
30 Kopplungspuffer und eine Lösung des Chelators von 1 mg/ml in 2% DMSO/Wasser so gemischt, dass ein molärer Überschuß des Chelators gewährleistet war. Es folgte eine Inkubation

der Mischung von 1h bei 37°C. Anschließend wurde nicht gebundener Chelator durch Ultrafiltration im gleichen Gefäß (Centriprep YM-50 bzw. YM-10; Millipore) abgetrennt und wie oben beschrieben in den zur Radioaktivmarkierung notwendigen Beladungspuffer auf pH 4,2 umgepuffert (0,15 M Natriumacetat; 0,15 M Natriumchlorid, pH 4,2). Die Proteinkonzentration während und nach diesem Schritt wurde wieder auf 1-10 mg/ml mit Hilfe einer UV-Messung bei 280nm eingestellt.

10

Es waren Bedingungen für die Chelatisierungsreaktion zu finden, die eine Radiomarkierung des Antikörpers erlauben, ohne dessen Bioaktivität wesentlich zu mindern.

15 Der chelatisierte Antikörper wurde mit einem Radiometall beladen, wodurch der Radio-Antikörper erzeugt wurde. Zur Beladung wurden die Isotope  $^{111}\text{Indium}$  und  $^{90}\text{Yttrium}$  verwendet. Beide haben chemisch und physikochemisch vergleichbare Eigenschaften und werden durch den Chelator als dreiwertige Ionen gebunden ( $^{111}\text{In}^{3+}$ ,  $^{90}\text{Y}^{3+}$ ). Der mit  $^{111}\text{Indium}$  markierte Antikörper ist ein  $\gamma$ -Strahler und wird in der Klinik zur individuellen Dosisfindung für den Patienten verwendet, während  $^{90}\text{Yttrium}$  ein  $\beta$ -Strahler ist, der therapeutisch zum Einsatz kommt. Die Halbwertzeiten betragen für  $^{111}\text{In}$  67 Stunden und für  $^{90}\text{Y}$  64 Stunden.

Zur Beladung wurde  $^{111}\text{Indiumchlorid}$  der Firma NEN (Perkin Elmer, Belgien) verwendet. Die Lieferung des Radiometalls erfolgt in salzsaurer Lösung. Diese  $^{111}\text{InCl}_3$  Lösung wurde zunächst kurzzeitig auf eine HCl-Konzentration von 1M gebracht. Anschließend wurde mit 0,05M HCl auf eine spezifische Aktivität von 80-320mCi/ml verdünnt und davon



ein Aliquot zum Einbau in den chelatisierten Antikörper verwendet, wobei das zugegebene Volumen HCl-saurer  $^{111}\text{InCl}_3$ -Lösung gleich dem Volumen der vorgelegten Antikörperlösung im Kopplungspuffer pH 4,2 sein sollte, um die pH-Stabilität zu gewährleisten. Inkubationsdauer war 1h bei 37°C mit gelegentlichem vorsichtigem Mischen.

Im Anschluß daran wurde der Filtereinsatz wieder in die Filtrationshülse eingesetzt und wie oben beschrieben in Phosphatpuffer pH 7,2 mit physiologischem Gehalt an Kochsalz umgepuffert. Dabei erfolgte eine Trennung von hochmolekularem radioaktiv markiertem Antikörper und ungebundenem  $^{111}\text{InCl}_3$ . Die Quantifizierung des Einbaus von  $^{111}\text{In}$  in den chelatisierten Antikörper erfolgte dünn-schichtchromatographisch. Die Einbaurrate des Radiometalls lag bei 80-99% der eingesetzten Radioaktivität.

## 8. Zellbindungsversuche und Scatchard Analyse von radioaktiv-markierten Erkennungsmolekülen, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

Verschiedene Tumorzelllinien wurden zur Testung der Zellbindungsfähigkeit der radiomarkierten Erkennungsmoleküle herangezogen. Dabei wurde jeweils in Dublettbestimmungen eine bestimmte Anzahl Zellen in einem 1,5 ml Gefäß vorgelegt und mit steigenden Mengen Antikörper inkubiert. Nach dem Waschen wurde anhand der Zählrate bestimmt, wieviel Antikörper gebunden hat. Dieser Wert wurde als Verhältnis gebunden/nichtgebunden gegen die Menge gebunden in ein Diagramm aufgetragen und im linearen

Bereich der Kurve die Steigung ermittelt und der Abzissen-Schnittpunkt bestimmt (Scatchard Analyse s.u.). Pro Ansatz werden  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt. Nach Vorinkubation der Zellen für eine Stunde auf Eis wurde die benötigte Menge Zellen in Reaktionsgefäße vorgelegt, zentrifugiert (5min 1000xg, 25°C) und der Überstand abgenommen. Dann wurde mit PBS/0,1% Tween20/1% BSA aufgefüllt bis zum Volumen 200  $\mu$ l abzüglich der noch zuzugebenen Menge Erkennungsmolekül. Anschließend wurde das entsprechende Erkennungsmolekül zum Endvolumen 200  $\mu$ l zugegeben (ca. 40 bis 500 ng, je nach Erkennungsmolekül) und die Ansätze für eine Stunde bei 4-8°C inkubiert. Nach Zentrifugation (5min, 1000xg, 25°C) wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500  $\mu$ l PBST/1%BSA vorsichtig resuspendiert. Nach nochmaligem Waschen wurde das Zellpellet im Gefäß am gamma-Counter gemessen. Von den Ausgangslösungen definierter Konzentration wurden die spezifischen Zählraten bestimmt, der Wert in cpm/ng wurde der Relativierung der Messwerte von gebundenem Antikörper zugrunde gelegt. Die Abzissenwerte sind in gebundene Moleküle Antikörper pro Zelle (r) aufgetragen. Der jeweilige Ordinatenwert ist der Quotient aus Bindung (r) zu freier Bindung, wobei die freie Bindung die Differenz aus Gesamtmenge und gebundener Menge Antikörper (in Abbildung 12 Angaben in M) darstellt. Der Abzissen-Schnittpunkt bezeichnet die Anzahl der Bindungsplätze/Zelle. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Assoziationskonstante  $K_{ass}$  in  $[M^{-1}]$ .

In Abbildung 11 sind beispielhaft die Scatchard-Analysen der Bindung der radioaktivmarkierten Erkennungsmoleküle im scFv-Format mit den Sequenzen SEQ ID NO. 36 (monovalenter scFv, Abb. 11a) und 45 (Multibody, Abb. 11b) an T47D Zellen dargestellt, wobei sich unter diesen Bedingungen für den

monovalenten scFv eine Kass von  $4,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  und  $5,3 \times 10^6$  Bindungsplätze/Zelle sowie für den Multibody eine Kass von  $1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  bzw.  $2,6 \times 10^6$  Bindungsplätze/Zelle ermitteln lassen.

- 5 In Tabelle 8 sind die Assoziationskonstanten und die Anzahl der Zellbindungsplätze verschiedener Antikörper und Antikörperformate an K562 Zellen zusammengefaßt und mit dem HMFG-1, der unter gleichen Bedingungen eingesetzt und getestet wurde, verglichen.

10

Tabelle 8: Zellbindungstest und Scatchard-Analyse mit radioaktivmarkierten Erkennungsmolekülen an K562 Zellen.

Antikörper	Kass [M <sup>-1</sup> ]	Anzahl Bindungsplätze/Zelle
mIgG-Panko2	$2 \times 10^9$	$1,2 \times 10^5$
HMFG-1	$3,9 \times 10^8$	$9,6 \times 10^4$
cIgG-Panko1	$1,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^5$
SEQ ID NO. 46	$4,4 \times 10^7$	$4,5 \times 10^5$

15

9. Biodistribution der radioaktiv-markierten Erkennungsmoleküle, die das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch erkennen, in einem *in vivo* Tumormodell

20

Als Tumormodell wurde humanes Colonkarzinomgewebe (Xenograft #5841) auf Nacktmäuse (Ncr: nu/nu, weiblich) subkutan transplantiert. Nach ca. 3-4 Wochen ist der Tumor unter der Haut tastbar. Den Tumor-tragenden Mäusen (pro Zeitpunkt n=5) wurden jeweils  $5 \mu\text{g } ^{111}\text{In}$ -markierter mIgG-Panko2 in  $200 \mu\text{l}$  i.v. in die Schwanzvene verabreicht. Nach

25

5min, 1h, 4h, 8h, 24h, 48h und 72h wurden die Mäuse getötet und die Verteilung der Radioaktivität im Tumor, im Serum und den Organen ermittelt. Die spezifische Anreicherung des mIgG-Panko2 im Tumor in %ID/g Tumor (bezogen auf die injizierte Dosis und das Tumorgeweicht), ist in Abbildung 12 dargestellt. Im Gegensatz dazu findet in den Organen und im Serum eine Abreicherung der Radioaktivität im angegebenen Zeitverlauf statt.

10

#### 10. Nachweis des Tumor-spezifischen, sekretorischen MUC1 im Sandwich-ELISA mit Erkennungsmolekülen, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

15 Tumor-spezifisches, sekretorisches MUC1 kann im Sandwich-ELISA nachgewiesen werden. Dabei dient ein MUC1 spezifischer Antikörper als Fänger-Antikörper von MUC1 und ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül zum Nachweis des Tumor-spezifischen MUC1. Um Core-1 positives, sekretorisches MUC1 nachzuweisen, dient beispielsweise ein erfindungsgemäßes Erkennungsmolekül als Fänger und ein Core-1 spezifischer Antikörper zum Nachweis des Core-1 Antigens. Ein dritter Enzym- oder Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper muss zur Detektion des Zweitantikörpers eingesetzt werden.

25

Als Beispiel wurden die Überstände von drei Tumorzelllinien analysiert (K562, ZR-75-1 und T47D). Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt.  $10^5$  Zellen pro ml Zellkulturmedium wurden ausgesät, 4 Tage ohne Mediumwechsel kultiviert, anschließend ein Aliquot abgenommen und der Zellkulturüberstand durch Zentrifugation vom Zellpellet getrennt. 50  $\mu$ l dieser Überstände wurden unverdünnt im ELISA eingesetzt.

Der Sandwich-ELISA wurde durchgeführt, indem die Mikrotiterplatte mit dem Fänger-Antikörper (HMFG-1 oder mIgG-Panko2, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet wurde. - Es wurden drei verschiedenen Konzentrationen des Antikörpers für die Beschichtung getestet (1  $\mu\text{g/ml}$ , 2  $\mu\text{g/ml}$  und 4  $\mu\text{g/ml}$ ). Die Beschichtung mit 1  $\mu\text{g/ml}$  erwies sich im Sandwich-ELISA als am empfindlichsten. - Anschließend wurden die beschichteten Platten zweimal mit PBS gewaschen und 1,5 h in 5% BSA, 0,05% Tween 20 in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Der Blockierungspuffer wurde entfernt, die Platten erneut einmal mit 0,1% Tween 20 in PBS (Waschpuffer) gewaschen, die Proben dazugegeben und 1,5 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Negativkontrollen wurden das Zellkulturmedium oder 2% BSA in Waschpuffer (Verdünnungspuffer für Zweitantikörper) verwendet. Eine Positivkontrolle stand nicht zur Verfügung. Für den MUC1-Core-1-Sandwich-ELISA erfolgte nach dreimaligem Waschen die Neuraminidase-Behandlung in den dafür vorgesehenen Wells. Zu diesem Zweck wurde die Neuraminidase-Lösung (DADE Behring, Deutschland) in Imidazolpuffer (0,68 g Imidazol, 0,19 g  $\text{CaCl}_2$  und 0,4 g NaCl in 100 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , pH 6,8) 1:5 verdünnt und 50  $\mu\text{l/well}$  30 min bei 37 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde der Imidazolpuffer ohne Neuraminidase-Lösung in einem entsprechenden Well inkubiert. Anschließend wurden die Wells dreimal gewaschen und der biotinylierte mIgG-Panko2 (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) bzw. ein anti-Core-1 Antikörper (mIgM-Karo4) zum Nachweis des MUC1 bzw. des Core-1 tragenden MUC1 in 2% BSA in Waschpuffer dazugegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem dreimaligen Waschen folgte die Zugabe von Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin bzw. eines

anti-IgM( $\mu$ ) Antikörpers Peroxidase-gekoppelt (Dianova) 1:300 bzw. 1:5000 verdünnt in 2% BSA in Waschpuffer und eine Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Platten zweimal in Waschpuffer und einmal in PBS gewaschen. Die Färbereaktion erfolgte in 25 mM Zitronensäure, Phosphatpuffer pH 5,0 mit 0,04% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 0,4 mg/ml o-Phenylendiamin (Sigma) im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2,5 N Schwefelsäure (Endkonzentration 0,07 N) gestoppt und im ELISA-Reader bei 492 nm mit einem Referenzfilter von 620 nm vermessen.

Tabelle 9: Analyse von Tumor-spezifischem, sekretorischem MUC1 in Kulturüberständen zweier Zelllinien und Detektion von Core-1 vor und nach Neuraminidase Behandlung im Sandwich ELISA.

Fänger Ab	HMFG-1	mIgG-Panko2	
Nachweis- Ab  Zelllinie	mIgG- Panko2	anti-Core-1 (mIgM-Karo4)	
		- Neuraminidase	+ Neuraminidase
K562	+	-	+
ZR-75-1	+++	-	+
T47D	++	-	+++

11. Nachweis von MUC1 im Serum von Colonkarzinom-Patienten durch Erkennungsmoleküle, die das glykosylierte MUC1 Tumorepitop spezifisch erkennen

Zum Nachweis von löslichem MUC1 in Patienten-Seren wurde ein Sandwich-ELISA wie oben beschrieben verwendet. Als Fänger-Antikörper wurde der anti-MUC1 Antikörper 115D8 (Fänger im kommerziellen CA 15-3 Test) oder der mIgG-Panko2 (1 µg/ml PBS) verwendet. Nach dem Blocken mit 2% BSA/PBS wurden die Seren aufgetragen. Es wurden 24 verschiedene Colonkarzinom-Patientenseren in verschiedenen Verdünnungen (unverdünnt bis 1:32 verdünnt) untersucht. Als Standard dienten Verdünnungen eines definierten Serums eines Mammarkarzinom-Patienten (152 U/ml, Enzymun-Test CA 15-3, Boehringer Mannheim). Als Grenzwert wurden 23 U/ml (in der Literatur Durchschnittswert für Normalseren) festgelegt. Zum Nachweis des gebundenen MUC1 wurde der mIgG-Panko2 mit zwei anderen anti-MUC1 Antikörpern, dem DF3 (Nachweisantikörper im CA 15-3 Test) und dem HMFG-1, verglichen. Alle drei Antikörper wurden biotinyliert (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce) eingesetzt und nach dreimaligem Waschen mit PBS + 0,1% Tween20 mit Streptavidin-POD gekoppelt (1:300 in 0,2% BSA/PBS) und TMB als Peroxidase-Substrat (vgl. oben) nachgewiesen.

In Tabelle 10 sind die Daten zusammengefaßt. Löslichem MUC1 im Serum von Colonkarzinom-Patienten wird mit dem erfindungsgemäßen Erkennungsmolekül mIgG-Panko2 deutlich weniger gebunden als mit den bekannten anti-MUC1 Antikörpern DF3 und HMFG-1.

**Tabelle 10:** Nachweis von Serum-MUC1 im ELISA unter Verwendung verschiedener anti-MUC1 Antikörper.

30

Fänger- antikörper	Nachweis- antikörper	Proben über Grenzwert/Gesamtproben	%
-----------------------	-------------------------	---------------------------------------	---

115D8	DF3	20/24	83
	HMFG-1	22/24	92
	mIgG-Panko2	8/24	33
mIgG-Panko2	mIgG-Panko2	8/24	33
		1/12	8

### Legende zu den Abbildungen

5

Abb. 1: Vektor zur Klonierung und bakteriellen Expression von single chain Antikörperfragmenten.

10

Abb. 2: Klonierungsschema zur Herstellung von single chain Antikörperfragmenten mit unterschiedlicher Linkerlänge.

15

Abb. 3: Vektorsystem zur Klonierung und eukaryontischen Expression von chimären Antikörpern im IgG1 oder IgM-Format.

20

Abb. 4: Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle mIgG-Panko1 und mIgG-Panko2 an glykosyliertes und nicht-glykosyliertes MUC1 Peptid im ELISA. Als Antigene wurde das nicht-glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS und das glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDT[GalNAc $\alpha$ ]RPAPGSTAPPAHGVTS

25

verwendet und in PBS an die Platte gebunden. Die Antikörper mIgG-Panko1 und mIgG-Panko2



wurden in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{g/ml}$  im ELISA eingesetzt.

Abb. 5:

Vergleich der spezifischen Bindung der anti-MUC1 Antikörper HMFG-1, C595 und SM3 mit mIgG-Panko1 und mIgG-Panko2 an glykosyliertes und nicht-glykosyliertes MUC1 Peptid im ELISA. Als Antigene wurde das nicht-glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS und das glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDT[GalNAc $\alpha$ ]RPAPGSTAPPAHGV TSA verwendet und in  $\text{H}_2\text{O}$  an die Platte angetrocknet. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{g/ml}$  im ELISA eingesetzt.

Abb. 6:

Spezifische Bindung verschiedener bevorzugter Formate erfindungsgemäßer Erkennungsmoleküle im ELISA, beispielhaft am nicht-glykosylierten und glykosylierten 30-mer MUC1 Peptid. Als Antigene wurde das nicht-glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS und das glykosylierte 30-mer mit der Sequenz APPAHGVTSAPDT[GalNAc $\alpha$ ]RPAPGSTAPPAHGV TSA verwendet und in PBS an die Platte gebunden. Die beiden scFv Formate SEQ ID NO. 36 und 45 wurden mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , der murine IgG mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  und der chimäre IgG mit 0,01  $\mu\text{g/ml}$  eingesetzt. Da für die verschiedenen Formate unterschiedliche Sekundärantikörper verwendet

werden, sind die ELISA Daten nur qualitativ zu bewerten.

Abb. 7:

Abhängigkeit der Bindung der erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküle mIgG-Pankol und mIgG-Panko2 von der Anzahl der Tandem Repeats im nicht-glykosylierten MUC1-Peptiden im Vergleich zu den MUC1-spezifischen Antikörpern SM3 und C595 im ELISA. Als Antigene wurde eine Serie von glykosylierten MUC1-Peptiden unterschiedlicher Länge der Sequenz  $[VTSAPDTRPAPGSTAPPAHG]_n$ , wobei  $n = 1, 3$  und  $5$  (TR1, TR3 und TR5) ist, verwendet und in  $H_2O$  an die Platte angetrocknet. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von  $10 \mu g/ml$  eingesetzt.

Abb. 8:

Abhängigkeit der Bindung des erfindungsgemäßen Erkennungsmoleküls mIgG-Panko2 von der Anzahl der Tandem Repeats (multiple glykosylierte PDTR-Regionen) im Vergleich zu den MUC1-spezifischen Antikörpern SM3 und C595 im ELISA. Als Antigene wurde eine Serie von glykosylierten MUC1-Peptiden unterschiedlicher Länge der Sequenz  $A[HGVTSAPDT(GalNAc\alpha)RPAPGSTAPPA]_n$ , wobei  $n = 1, 3$  und  $5$  (TR1g, TR3g und TR5g) ist, verwendet und in  $H_2O$  an die Platte angetrocknet. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von  $10 \mu g/ml$  eingesetzt.

Abb. 9: Fluoreszenzmarkierung von Zellen der Tumorzelllinie T47D (Mammakarzinom) mit dem MUC1 spezifischen Erkennungsmolekül mIgG-Panko2.

5

Abb. 10: Fluoreszenzmarkierung von Zellen der Tumorzelllinie K562 (erythroide Leukämie) mit dem MUC1 spezifischen Erkennungsmolekül cIgG-Panko1.

10

Abb. 11: Scatchard-Diagramm zur Analyse der Zellbindung radioaktiv markierter MUC1-spezifischer Erkennungsmoleküle. Beispielfhaft sind hier die Bindungsdaten der beiden scFv Formate SEQ ID NO. 37 (a) und SEQ ID NO. 46 (b) dargestellt. r: gebundene Moleküle pro Zelle, A: eingesetzte Konzentration des radioaktiv markierten Erkennungsmoleküls [M], x: an die Zellen gebundener Anteil [M]. Die Differenz A-x stellt die Konzentration der freien Erkennungsmoleküle im Ansatz dar. Oben ist die entsprechende Geradengleichung angegeben, wobei der Geradenanstieg die Assoziationskonstante wiedergibt.

15

20

25

Abb. 12: Spezifische Anreicherung des radioaktiv-markierten Erkennungsmoleküls mIgG-Panko2 im Tumor in einem Maus-Xenotransplantat-Modell. Den Tumor-tragenden Mäusen (pro Zeitpunkt n=5) wurden jeweils 5  $\mu\text{g}$   $^{111}\text{In}$ -markierter mIgG-Panko2 i.v. verabreicht. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Mäuse

30

getötet und die Anreicherung im Tumor, bezogen auf die injizierte Dosis und das Tumorgeweicht (%ID/g), bestimmt.

5

### Referenzen

- Boel E et al. J Immunol Methods 239: 153-66 (2000).  
 Brechbiel MW et al. Inorg Chem 25: 2772-2781 (1986).  
 10 Chothia C et al. Science 233, 755-758 (1986).  
 Chothia C et al. Nature 342, 877-883 (1989).  
 Chothia C et al. J Mol Biol 227, 799-817 (1992).  
 Chothia C & Lesk AM. J Mol Biol 196, 901-917 (1987).  
 Dai J et al. Tumor Biol 19 (suppl 1): 100-110 (1998).  
 15 Herrera AM et al. Biochem Biophys Res Com 273: 557-559  
 (2000).  
 Hinoda Y et al. Gastroenterol Jpn 27: 390-395 (1992).  
 Jensen KB et al. Biochem Biophys Res Com 298: 566-573  
 (2002).  
 20 Kozak RW et al. Cancer Res 49: 2639-2644 (1989).  
 Liao et al. Biotechnol Bioeng 73, 313-323 (2000).  
 Martin ACR & Thornton JM. J Mol Biol 263, 800-815 (1996).  
 Nuttall SD et al. Proteins 36, 217-227 (1999).  
 Nygren PA & Uhlen M. Cur Opin Struc Biol 7: 463-469 (1997).  
 25 Rooman MJ et al. Protein Eng 3, 23-27 (1989).  
 Skerra A. J Mol Recog 13, 167-187 (2000).  
 Stimmel JB et al. Bioconj Chem 6: 219-225 (1995).  
 Tonye Libyh M. et al. Blood 90(10): 3978-83 (1997).  
 US 5,506,343  
 30 US 5,683,674  
 US 5,804,187  
 US 6,315,997

WO 0244217

WO 9320841

Wu S & Cygler M. J Mol Biol 229, 597-601 (1993).

5

10



15

20



Sequenzliste

## CDR Sequenzen

5

SEQ ID NO. 1           DAWMD  
 SEQ ID NO. 2           NYWMN

10

SEQ ID NO. 3           EIRSKANNHATYYAESVKG  
 SEQ ID NO. 4           EIRLKSNNYTTHYAESVKG

SEQ ID NO. 5           GGYGFDY  
 SEQ ID NO. 6           HYYFDY

15

SEQ ID NO. 7           RSSQSIVHSNGNTYLE  
 SEQ ID NO. 8           RSSKSLLSNGITYFF

SEQ ID NO. 9           KVSNRFS  
 SEQ ID NO. 10          QMSNLAS

20

SEQ ID NO. 11          FQGSHPPLT  
 SEQ ID NO. 12          AQNLELPPT

## 25 CDR Sequenzen (canonical structure variants)

30

SEQ ID NO. 13          NYWVN  
 SEQ ID NO. 14          NYWIN  
 SEQ ID NO. 15          NYWYN  
 SEQ ID NO. 16          NYWWN  
 SEQ ID NO. 17          DAWID  
 SEQ ID NO. 18          DAWVD  
 SEQ ID NO. 19          DAWYD  
 SEQ ID NO. 20          DAWWD

35

SEQ ID NO. 21          EIRSKANNYATYYAESVKG  
 SEQ ID NO. 22          EIRLKSNNYTTHYAESVKG  
 SEQ ID NO. 23          EIRLKSNSYTTHYAESVKG

40

SEQ ID NO. 24          RPSQSIVHSNGNTYLE  
 SEQ ID NO. 25          RSSQSIVHSNGNTYFE  
 SEQ ID NO. 26          RPSQSIVHSNGNTYFE  
 SEQ ID NO. 27          RPSKSLLSNGITYFF  
 SEQ ID NO. 28          RSSKSLLSNGITYLF

45

SEQ ID NO. 29          RPSKSLLSNGITYLF

SEQ ID NO. 30          FQGSHPPLT

SEQ ID NO. 31            AQNLEPPPT

variable schwere Ketten

5

SEQ ID NO. 32  
EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS

10

SEQ ID NO. 33  
EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
THYAESVKGRFTISR DSKSSVSLQMNNL RVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSS

15 variable leichte Ketten

SEQ ID NO. 34  
DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR  
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKRA

20

SEQ ID NO. 35  
DIVMTQAAFSNPVTTLGTSASISCRSSKSLHSNGITYFFWYLQKPGLSPOLLIYQMSNL  
ASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGGTKLEIKRA

25

VH/VL Paarungen

Pankol                    SEQ ID NO. 32  
                          SEQ ID NO. 34

30

Panko2                   SEQ ID NO. 33  
                          SEQ ID NO. 35

35 verschiedene single chain Fv Formate

SEQ ID NO. 36  
EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
40 ASSGGGGSGGGGSGGSARDIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWY  
LQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVP  
LTFGDGTKLELKRAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNGAA

45

SEQ ID NO. 37  
EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSGSGSSADIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPK

LLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKL  
ELKRAAAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

SEQ ID NO. 38

5 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSGSSADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLI  
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLE  
10 LKRAAAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

SEQ ID NO. 39

15 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSGSSADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLL  
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLEL  
KRAAAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

SEQ ID NO. 40

20 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSSSADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLI  
YKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLELK  
25 RAAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

SEQ ID NO. 41

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSSADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIY  
30 KVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLELKR  
AAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

SEQ ID NO. 42

35 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASSADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK  
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLELKRA  
AAHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA

40 SEQ ID NO. 43

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISR DVS KSSVYLQMN LRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
ASADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV  
45 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGTKLELKRAA  
AHHHHHHGAAEQKLI SEEDLNAA



SEQ ID NO. 44

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 TYAESVKGRFTISRVDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
 AADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
 5 NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKRAAA  
 HHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 45

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 10 TYAESVKGRFTISRVDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
 ADIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKRAAAH  
 HHHHHHGAAEQKLISEEVHQ

15 SEQ ID NO. 46

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 TYAESVKGRFTISRVDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSS  
 DIVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
 20 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKRAAAHH  
 HHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 47

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 TYAESVKGRFTISRVDVSKSSVYLQMNNLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSD  
 25 IVLTQTPLSLPVS LGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVS  
 SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGDGTKLELKRAAAHHH  
 HHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 48

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 30 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSGGGGSGGGGSGGSARDIVMTQA AFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYFFWYL  
 QKPGLSPQLLIYQMSN LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPP  
 TFGGGTKLEIKRAAAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

35

SEQ ID NO. 49

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSGSGSSADIVMTQA AFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYFFWYLQKPGLSPQL  
 40 LIYQMSN LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLE  
 IKRAAAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 50

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 45 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSGGSSADIVMTQA AFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYFFWYLQKPGLSPQL  
 IYQMSN LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEI  
 KRAAAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 51

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 5 SSGSSADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLI  
 YQMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIK  
 RAAAHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 52

10 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSSSADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIY  
 QMSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKR  
 AAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

15 SEQ ID NO. 53

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSSADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQ  
 20 MSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRA  
 AAHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 54

25 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SSADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQM  
 SNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAA  
 AHHHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

30 SEQ ID NO. 55

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 SADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMS  
 35 NLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAAA  
 HHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 56

40 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 ADIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSN  
 LASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAAAH  
 HHHHHHGAAEQKLISEEDLNAA

SEQ ID NO. 57

45 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSA  
 DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNL

ASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAAAHH  
HHHGAAEQKLISEEDLNGAA

SEQ ID NO. 58

5 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSSD  
IVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNLA  
SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAAAHHH  
HHHGAAEQKLISEEDLNGAA

10

SEQ ID NO. 59

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNLRVEDTGIYYCTRHYFFDYWGQGTTLTVSDI  
VMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNLAS  
15 GVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRAAAHHHH  
HHGAAEQKLISEEDLNGAA

Murine Antikörper

20

leichte Kette eines murinen IgG1 (kappa Kette)

SEQ ID NO. 60

25 DIVLTQTPLSLPVSLGDAQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR  
FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGDGKLELKRADAAP  
TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST  
YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE

SEQ ID NO. 61

30 DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSHNGITYFFWYLQKPGLSPQLLIYQMSNL  
ASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVIYCAQNLELPPTFGGGTKLEIKRADAAP  
TVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDST  
YSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE

35

schwere Kette muriner IgG1

SEQ ID NO. 62

40 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
TYAESVKGRFTISRVDKSSVYLQMNLRVEDTGIYYCTRGGYGFYWGQGTTLTVSA  
KTTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLESD  
LYTLSSSVTVPPSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI  
FPPKPKDVLTTITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQTQPREEQFNSTFR  
SVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAK  
45 DKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMNNTNGSYFVYSKLVQKSNWEA  
GNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

SEQ ID NO. 63

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNRLVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVSAK  
 TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFFPAVLES DL  
 5 YTLSSSVTVPSSPRPSETVTCNVAHPASSTKVDK KIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIF  
 PPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRS  
 VSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD  
 KVS LTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MNNTNGSYFVYSKLVQKSNWEAG  
 NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHSPGK

10

murine Antikörper

mIgG-Panko1 SEQ ID NO. 60

15

SEQ ID NO. 62

mIgG-Panko2 SEQ ID NO. 61

SEQ ID NO. 63

20

Chimäre Antikörper (Maus/Mensch)

schwere Kette chimärer IgG1 (gamma Kette)

25 SEQ ID NO. 64

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 TYAESVKGRFTISR DSVSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSG  
 STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSS  
 GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG  
 30 GPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
 RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD  
 KSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 SEQ ID NO. 65

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLS CVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDSKSSVSLQMNRLVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVSGS  
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFFPAVLQSSG  
 LYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
 40 PSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY  
 NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
 DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK  
 SRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

schwere Kette eines chimären IgM (mu Kette)

SEQ ID NO. 66

5 EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHA  
 TYAESVKGRFTISRDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTRGGYGFDYWGQGTTLTVSG  
 SASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVL  
 RGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP  
 RDGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKV  
 TSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLT  
 10 KSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWN  
 SGERFTCTVTHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG  
 FSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCV  
 VAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

15 SEQ ID NO. 67

EVKLVESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYT  
 THYAESVKGRFTISRDDS KSSVSLOMNNLRVEDTGIYYCTRHYYFDYWGQGTTLTVSGS  
 ASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSVL  
 20 GGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVSFVFP  
 DGFFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESGPTTYKVT  
 STLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQONASSMCVPDQDTAIRVFAIPPSFASIFLT  
 STKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEASICEDDWN  
 GERFTCTVTHTDLPSPKQTI SRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESATITCLVTG  
 SPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEEWNTGETYTCV  
 25 AHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

leichte Kette eines chimären IgG1 oder IgM (kappa Kette)

30 SEQ ID NO. 68

DIVLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNR  
 FSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGDGKLELKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

35

SEQ ID NO. 69

DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLSNGITYFFWYLQKPGLSPPQLLIYQMSNL  
 ASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLLELPPTFGGGTKLEIKRTVAAP  
 SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST  
 40 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

chimäre Antikörper

45 cIgG-Panko1

SEQ ID NO. 64

SEQ ID NO. 68

cIgG-Panko2

SEQ ID NO. 65

SEQ ID NO. 69

cIgM-Pankol

SEQ ID NO. 66

SEQ ID NO. 68

5

cIgM-Pankol

SEQ ID NO. 67

SEQ ID NO. 69

Patentansprüche

1. Erkennungsmolekül, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die

- 5 (i) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 1 oder 2 und  
(ii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 3 oder 4 und  
(iii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 5 oder 6 enthält  
und

das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

10 2. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 5 enthält und das glykosylierte  
15 MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

3. Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass es eine Aminosäuresequenz umfasst, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 2 und SEQ ID NO. 4 und SEQ ID NO. 6 enthält und das glykosylierte  
20 MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

4. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 3, **dadurch gekennzeichnet**, dass es weiterhin eine Aminosäuresequenz umfasst, die  
25

- (i) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 7 oder 8 und  
(ii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 9 oder 10 und  
(iii) die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 11 oder 12  
enthält und

30 das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

5. Erkennungsmolekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es weiterhin eine Aminosäuresequenz umfasst, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 7 und SEQ ID NO. 9 und SEQ ID NO. 11 enthält und das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.
6. Erkennungsmolekül nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass es weiterhin eine Aminosäuresequenz umfasst, die die Aminosäuresequenzen SEQ ID NO. 8 und SEQ ID NO. 10 und SEQ ID NO. 12 enthält und das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.
7. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass es durch Mutation, Deletion und/oder Insertion in mindestens einer der Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 12 modifiziert ist und das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.
8. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Aminosäure mindestens einer Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1 bis 12 durch eine Aminosäure mit analogen physikochemischen Eigenschaften ersetzt ist und dass das Erkennungsmolekül das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.
9. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 1 oder 2 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID



NO. 13 bis 20 ersetzt ist und/oder mindestens eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 3 oder 4 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 21 bis 23 ersetzt ist und/oder mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 7 oder 8 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 24 bis 29 ersetzt ist und/oder mindestens eine Sequenz der Sequenzen SEQ ID NO. 11 oder 12 durch eine äquivalente kanonische Strukturvariante gemäß SEQ ID NO. 30 oder 31 ersetzt ist und das Erkennungsmolekül das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

10. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass es Aminosäuresequenzen umfasst, die mindestens eine Homologie von mindestens 60%, vorzugsweise 70%, bevorzugt 80%, ganz besonders bevorzugt 90%, gegenüber den Sequenzen SEQ ID NO. 1 bis 12 aufweist, wobei das Erkennungsmolekül das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch bindet.

11. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es weiterhin Gerüstsequenzen umfasst, die die Aminosäuresequenzen voneinander trennen und/oder flankieren.

12. Erkennungsmolekül nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüstsequenzen ausgewählt sind aus der Gruppe umfassend die Immunglobulin-Superfamilie, Protease-Inhibitoren, Lektine, Helix-Bündel-Proteine und/oder Lipocaline.

13. Erkennungsmolekül nach Anspruch 11 oder 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Gerüstsequenzen Antikörpergerüstsequenzen sind.

5 14. Erkennungsmolekül nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen für das Erkennungsmolekül nach Anspruch 1, 2 oder 3 Sequenzen der variablen schweren Kette VH und die Antikörpergerüstsequenzen für die zusätzlichen Sequenzen des Erkennungsmoleküls nach Anspruch 4, 5 oder 6 Sequenzen der variablen leichten Kette VL sind.

10

15

15. Erkennungsmolekül nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen murinen Ursprungs sind.

16. Erkennungsmolekül nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen humanen Ursprungs sind.

20

25

17. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen aus Gerüstsequenzen oder Kombinationen der Gerüstsequenzen gemäß den Ansprüchen 15 oder 16 abgeleitet sind.

30

18. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 11 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörpergerüstsequenzen

a) FRH1, FRH2, FRH3 und FRH4 für die variable schwere Kette VH folgende Aminosäuresequenzen sind, wobei

die Aminosäureposition der Nummerierung nach Kabat  
entspricht:

für FRH1 an Position	1	E
	2	V
	3	K
	4	L
	5	V
	6	E
	7	S
	8	G
	9	G
	10	G
	11	L
	12	V
	13	Q
	14	P
	15	G
	16	G
	17	S
	18	M
	19	K
	20	L
	21	S
	22	C
	23	A oder V
	24	A, V, S oder T
	25	S
	26	G
	27	Y, F, S oder D
	28	T
	29	F, L oder I
	30	S

5

10

15

20

25

30

für FRH2 an Position

36 W

37 V

38 R

39 Q

40 S

41 P

42 E

43 K

44 G

45 L

46 E

47 W

48 V

49 A

für FRH3 an Position

66 R

67 F

68 T

69 I

70 S

71 R

72 D

73 D oder V

74 S

75 K

76 S

77 S

78 V

79 Y oder S

80 L

81 Q

82 M

82a N

5

10

15

20

25

30

5

82b N  
82c L  
83 R  
84 A oder V

10

85 E  
86 D  
87 T  
88 G  
89 I  
90 Y  
91 Y  
92 C  
93 T

15

für FRH4 an Position

94 R, G, N, K oder S

103 W  
104 G  
105 Q  
106 G  
107 T

20

108 T  
109 L  
110 T

25

111 V  
112 S  
113 S oder A

30

b) FRL1, FRL2, FRL3 und FRL4 für die variable leichte Kette VL folgende Aminosäuresequenzen sind, wobei die Aminosäureposition der Nummerierung nach Kabat entspricht:

für FRL1 an Position 1 D  
2 I, V oder L

5

10

15

20

25

30

für FRL2 an Position

3	V
4	M oder L
5	T
6	Q
7	T oder A
8	P oder A
9	L oder F
10	S
11	L oder N
12	P
13	V
14	S oder T
15	L
16	G
17	D oder T
18	Q oder S
19	A
20	S
21	I
22	S
23	C
35	W
36	Y
37	L
38	Q
39	K
40	P
41	G
42	Q oder L
43	S
44	P
45	K oder Q

5

für FRL3 an Position

10

15

20

25

30

46	L
47	L
48	I oder V
49	Y
57	G
58	V
59	P
60	D
61	R
62	F
63	S
64	G oder S
65	S
66	G
67	S
68	G
69	T
70	D
71	F
72	T
73	L
74	K oder R
75	I
76	S
77	R
78	V
79	E
80	A
81	E
82	D
83	L oder V
84	G

		85	V
		86	Y
		87	Y
		88	C
5	für FRL4 an Position	98	F
		99	G
		100	G oder D
		101	G
		102	T
10		103	K
		104	L
		105	E
		106	I oder L
		106a	K
15		107	R
		108	A

19. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine  
20 Kombination der Sequenzen SEQ ID NO. 32 und 34 oder die  
humanisierten Varianten dieser Sequenzen umfasst.
20. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 18,  
dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine  
25 Kombination der Sequenzen SEQ ID NO. 33 und 35 oder die  
humanisierten Varianten dieser Sequenzen umfasst.
21. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 20,  
dadurch gekennzeichnet, dass die variable schwere Kette  
30 VH und die variable leichte Kette VL auf verschiedenen  
Polypeptidketten liegen.



22. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die variable schwere Kette VH und die variable leichte Kette VL miteinander in einem Fusionsprotein direkt verbunden sind.

5

23. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass die Ketten in einem Fusionsprotein über einen Linker verbunden sind.

10

24. Erkennungsmolekül nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Linker aus 1 bis 9 Aminosäuren besteht.

15

25. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass es von einem Immunglobulin abgeleitet ist.

20

26. Erkennungsmolekül nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es ein single chain Antikörperfragment, einen Multibody, ein Fab-Fragment, ein Fusionsprotein aus einem Antikörperfragment mit Peptiden oder Proteinen und/oder ein Immunglobulin der Isotypen IgG, IgM, IgA, IgE, IgD und/oder deren Subklassen umfasst.

25

27. Erkennungsmolekül nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass es einen murinen, chimärisierten, humanisierten, humanen, partiell humanen Antikörper oder Antikörperfragment umfasst.

30

28. Erkennungsmolekül nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Sequenz gemäß

SEQ ID NO. 36 bis 47, SEQ ID NO. 60, 62, 64, 66 oder 68 oder die humanisierten Varianten dieser Sequenzen umfasst.

5 29. Erkennungsmolekül nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, dass es mindestens eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 48 bis 59, SEQ ID NO. 61, 63, 65, 67 oder 69 oder die humanisierten Varianten dieser Sequenzen umfasst.

10

30. Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül zusätzlich mindestens ein His-Tag, myc-Tag, Lysinreiche Sequenzen und/oder Multimerisierungssequenzen umfasst.

15

31. Konstrukt umfassend die Erkennungsmoleküle nach einem der Ansprüche 1 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle mit Zusatzsequenzen und/oder Strukturen fusioniert, chemisch gekoppelt oder nicht-kovalent assoziiert sind.

20

32. Konstrukt nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle mit (i) Immunglobulindomänen verschiedener Spezies, (ii) Enzymmolekülen, (iii) Interaktionsdomänen, (iv) Domänen zur Stabilisierung, (v) Signalsequenzen, (vi) Fluoreszenzfarbstoffen, (vii) Toxinen, (viii) katalytischen Antikörpern, (ix) einem oder mehreren Antikörpern oder Antikörperfragmenten mit anderer Spezifität, (x) zytolytischen Komponenten, (xi) Immunmodulatoren, (xii) Immuneffektoren, (xiii) MHC-

25

30

Klasse I oder Klasse II Antigenen, (xiv) Chelatoren zur radioaktiven Markierung, (xv) Radioisotopen, (xvi) Liposomen, (xvii) Transmembrandomänen, (xviii) Viren und/oder (xix) Zellen fusioniert, chemisch gekoppelt, kovalent oder nicht-kovalent assoziiert sind.

33. Konstrukt nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen Makrophagen sind.

34. Isoliertes Nukleinsäuremolekül umfassend Nukleinsäuresequenzen, die die Aminosäuresequenz von mindestens einem Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 oder ein Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33 kodiert.

35. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, dass es eine genomische DNA, eine cDNA und/oder eine RNA ist.

36. Expressionskassette oder Vektor umfassend ein Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 34 oder 35 und einen Promotor, der operativ mit der Nukleinsäure verknüpft ist.

37. Virus umfassend mindestens einen Vektor oder eine Expressionskassette nach Anspruch 36.

38. Wirtszelle umfassend mindestens einen Vektor oder eine Expressionskassette nach Anspruch 36.

39. Wirtszelle nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle ist.
- 5 40. Wirtszelle nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Bakterien-, Hefe-, Pflanzen-, Insekten- und/oder Säugerzelle ist.
- 10 41. Wirtszelle nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Säugerzelle eine Hamster-, Maus- und/oder humane Zelle ist.
- 15 42. Wirtszelle nach einem der Ansprüche 38 bis 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle E. coli, S. cerevisiae, P. pastoris, D. melanogaster, CHO-K1, CHODhfr-, NS0, SP2/0, HEK 293, COS-1, COS-7, PER.C6, Namalwa oder K562 ist.
- 20 43. Wirtszelle nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirtszelle eine Effektorzelle ist.
- 25 44. Organismus umfassend mindestens eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 38 bis 42.
- 30 45. Organismus nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, dass der Organismus ein pflanzlicher oder tierischer transgener Organismus ist.
46. Zusammensetzung umfassend mindestens ein  
(i) Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30; und/oder

- (ii) Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33;  
und/oder
- (iii) Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 34 oder 35.

5 47. Zusammensetzung nach Anspruch 46, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zusammensetzung eine pharmazeutische Zusammensetzung, gegebenenfalls mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder Adjuvans, ist.

10

48. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 46 oder 47, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zusammensetzung:
- (i) ein radioaktiv-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 und/oder
  - 15 (ii) ein nicht-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 umfasst.

20

49. Zusammensetzung nach Anspruch 48, **dadurch gekennzeichnet, dass** das Erkennungsmolekül eine Sequenz nach einem der Ansprüche 19, 20, 28 oder 29 umfasst.

25

50. Zusammensetzung nach Anspruch 46 oder 47, **dadurch gekennzeichnet, dass** die Zusammensetzung eine Vakzinen-Zusammensetzung ist.

30

51. Verfahren zur Herstellung von Erkennungsmolekülen oder Konstrukten nach einem der Ansprüche 1 bis 33 umfassend

- (i) Einbringen eines oder mehrerer Nukleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 34 oder 35 und/oder einer Expressionskassette oder eines Vektors nach Anspruch 36 in ein Virus nach

Anspruch 37 oder in eine Wirtszelle nach einem der Ansprüche 38 bis 43; und

(ii) Kultivierung der Wirtszellen oder der Viren unter geeigneten Bedingungen; und

5 (iii) Gewinnung des Erkennungsmoleküls oder des Konstruktes, der Erkennungsmolekül oder Konstrukt tragenden Effektorzelle oder des Virus, das bzw. die das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch erkennt.

10

52. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 46 bis 50, umfassend eine Kombination eines Erkennungsmoleküls nach einem der Ansprüche 1 bis 30, eines Konstruktes nach einem der  
15 Ansprüche 31 bis 33, einer Nukleinsäure nach Anspruch 34 oder 35 und/oder einem Vektor nach Anspruch 36 mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger, einer Lösung und/oder einem Adjuvans.

20 53. Verfahren nach Anspruch 52, weiterhin umfassend den Schritt der Formulierung der Zusammensetzung in pharmazeutisch verträglicher und/oder wirksamer Form.

54. Verwendung eines Erkennungsmoleküls nach einem der  
25 Ansprüche 1 bis 30, eines Konstruktes nach einem der Ansprüche 31 bis 33, eines Nukleinsäuremoleküls nach Anspruch 34 oder 35, eines Vektors nach Anspruch 36, eines Virus nach Anspruch 37, einer Wirtszelle nach einem der Ansprüche 38 bis 43, eines Organismus nach  
30 Anspruch 44 oder 45 und/oder einer Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 46 bis 50 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie,

Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Tumorerkrankungen und/oder Metastasen.

- 5 55. Verwendung nach Anspruch 54 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von MUC1 positiven Tumorerkrankungen und/oder Metastasen.
- 10 56. Verwendung nach Anspruch 54 oder 55 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Karzinomen und/oder deren Metastasen.
- 15 57. Verwendung nach einem der Ansprüche 55 oder 56 zur Prophylaxe, Prävention, Diagnose, Verminderung, Therapie, Verlaufskontrolle und/oder Nachbehandlung von Mammarkarzinomen, Gastrointestinaltumoren, einschließlich Kolonkarzinomen, Magenkarzinomen, Dickdarmkrebs und Dünndarmkrebs, Pankreaskarzinomen, 20 Ovarialkarzinomen, Lungenkrebs, Leberkarzinomen, Nierenzellkarzinomen, Multiples Myelom und/oder deren Metastasen.
- 25 58. Verwendung nach einem der Ansprüche 54 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül ein nicht markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 oder Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33 ist.
- 30 59. Verwendung nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül an Makrophagen gebunden ist.

60. Verwendung nach Anspruch 58 or 59, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine Sequenz nach einem der Ansprüche 19, 20, 28 oder 29 umfasst.
- 5 61. Verwendung nach einem der Ansprüche 54 bis 57, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül ein radioaktiv-markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 oder Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33 ist.
- 10 62. Verwendung nach Anspruch 61, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle IgG oder Fragmente davon umfassen.
- 15 63. Verwendung nach Anspruch 61 oder 62, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle Multibodies umfassen.
- 20 64. Verwendung nach einem der Ansprüche 61 bis 63, dadurch gekennzeichnet, dass das Erkennungsmolekül eine Sequenz nach einem der Ansprüche 19, 20, 28 oder 29 umfasst.
- 25 65. Verwendung nach einem der Ansprüche 54 bis 64, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein nicht markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 oder Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33 und mindestens ein markiertes Erkennungsmolekül nach einem der Ansprüche 1 bis 30 oder Konstrukt nach einem der Ansprüche 31 bis 33 in Kombination verwendet werden.



66. Verwendung nach Anspruch 65, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Erkennungsmolekül eine Sequenz nach einem der Ansprüche 19, 20, 28 oder 29 umfasst.
- 5 67. Verfahren zur Herstellung eines Diagnostikums umfassend die Schritte des Anspruchs 51 zur Herstellung von Erkennungsmolekülen, die das glykosylierte MUC1-Tumorepitop spezifisch binden, und umfassend den Schritt der Formulierung der Erkennungsmoleküle in  
10 einer diagnostisch geeigneten Form.
68. Verfahren nach Anspruch 67, dadurch gekennzeichnet, dass die Erkennungsmoleküle biotinyliert, fluoreszenzmarkiert, radioaktiv-markiert, durch Enzymkopplung  
15 direkt markiert sind und/oder über einen sekundären entsprechend markierten Antikörper nachgewiesen werden.
69. Verwendung von einem der Verfahren nach Anspruch 67 oder 68, dadurch gekennzeichnet, dass das  
20 Erkennungsmolekül zur Diagnose von Tumorerkrankungen und/oder Metastasen, zur Prognose von Tumorerkrankungen und/oder zur Verlaufskontrolle von Tumorerkrankungen eingesetzt wird.
- 25 70. Verwendung nach Anspruch 69 und/oder des Verfahrens nach Anspruch 67 oder 68 zur Diagnose für das Antigen MUC1 tragende Tumoren und/oder Metastasen.
- 30 71. Verwendung nach Anspruch 70, dadurch gekennzeichnet, dass die Tumore Mammakarzinome, Gastrointestinaltumore, einschließlich Kolonkarzinome, Magenkarzinome, Dickdarmkrebs und Dünndarmkrebs, Pankreaskarzinome,

Ovarialkarzinome, Leberkarzinome, Lungenkrebs, Nierenzellkarzinome, Multiples Myelom und/oder deren Metastasen sind.

5 72. Verwendung nach einem der Ansprüche 69 bis 71, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Erkennungsmolekül in einem Gewebsschnelltest zum immunhistologischen Nachweis eingesetzt wird.

10 73. Verwendung nach einem der Ansprüche 69 bis 71, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Erkennungsmolekül in einem serologischen Test im Sandwich-Verfahren eingesetzt wird.

15 74. Verwendung nach einem der Ansprüche 69 bis 71, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens ein Erkennungsmolekül in einer in vivo Diagnostik in Form einer Radioimmundiagnostik, PET-Scan Verfahren und/oder Immunfluoreszenzendoskopie eingesetzt wird.

20

75. Verwendung nach einem der Ansprüche 69 bis 74, weiterhin umfassend mindestens einen weiteren Antikörper gegen mindestens ein weiteres Tumorantigen.

25 76. Kit umfassend ein Erkennungsmolekül gemäß einem der Ansprüche 1 bis 30 und/oder ein Konstrukt gemäß einem der Ansprüche 31 bis 33.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Erkennungsmoleküle, die gegen Tumore gerichtet sind, pharmazeutische Zusammensetzungen, die die  
5 Erkennungsmoleküle umfassen, Verfahren zur Herstellung der Erkennungsmoleküle und die Verwendung der Erkennungsmoleküle zur Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen.

**Abb. 1**

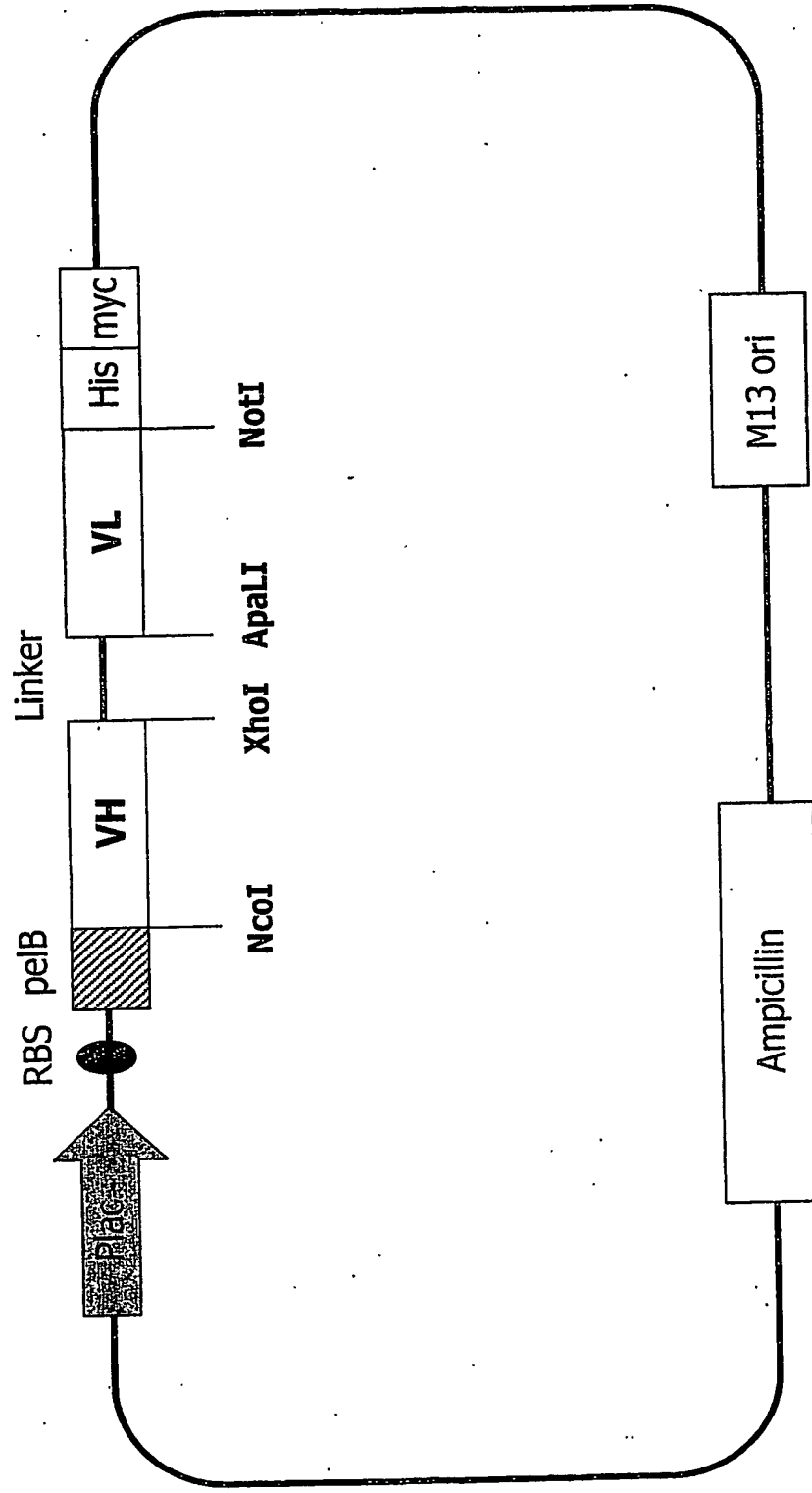
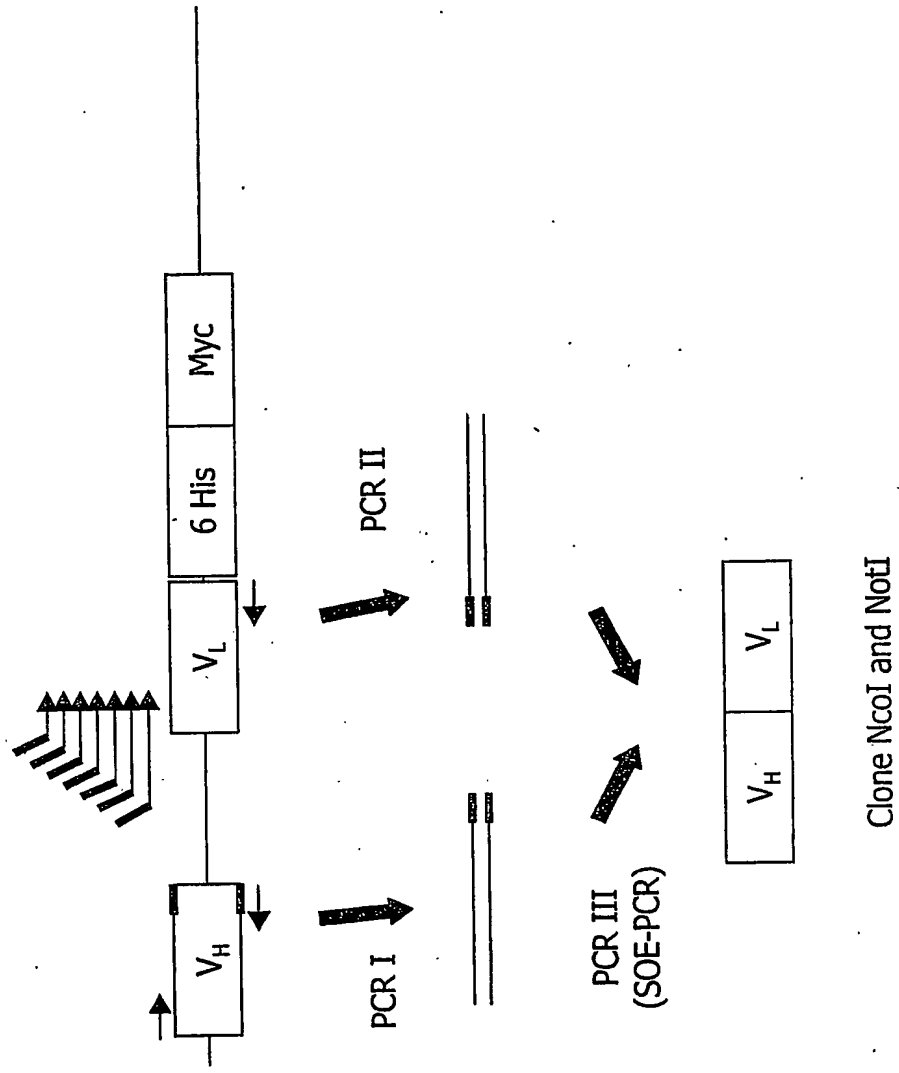
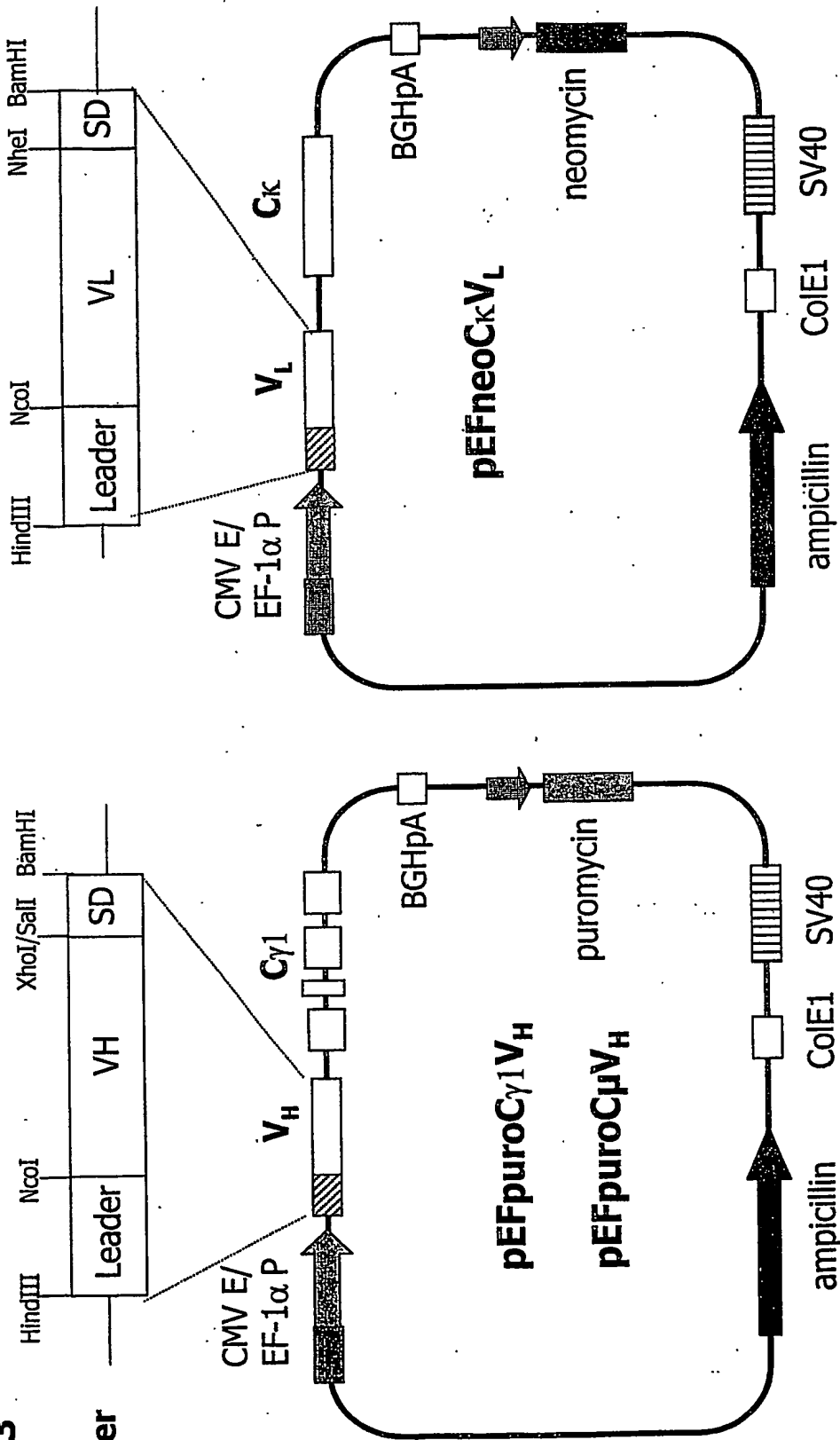


Abb. 2



**Abb. 3**

**BS-Leader**



**C $\gamma$ 1 constant region**

FOR: 5'-AATT GGATCC GAGCCAGACACTGGAC-3'

REV: 5'-ACCG TCTAGA CGCACTCATTTACCCGG-3'

**C $\mu$  constant region**

FOR: 5'-ATCGGGATCC GATAGCCATGACAGTCTG-3'

REV: 5'-AGC GTC TAG ACA GGG TCA GTA GCA GG-3'

**Kappa constant region**

FOR: 5'-ACCT GGATCC GCTAGGAAGAACTCAAAAC-3'

REV: 5'-ACCG TCTAGA CCTCTAACAACACTCTCCCTTG-3'

Abb. 4

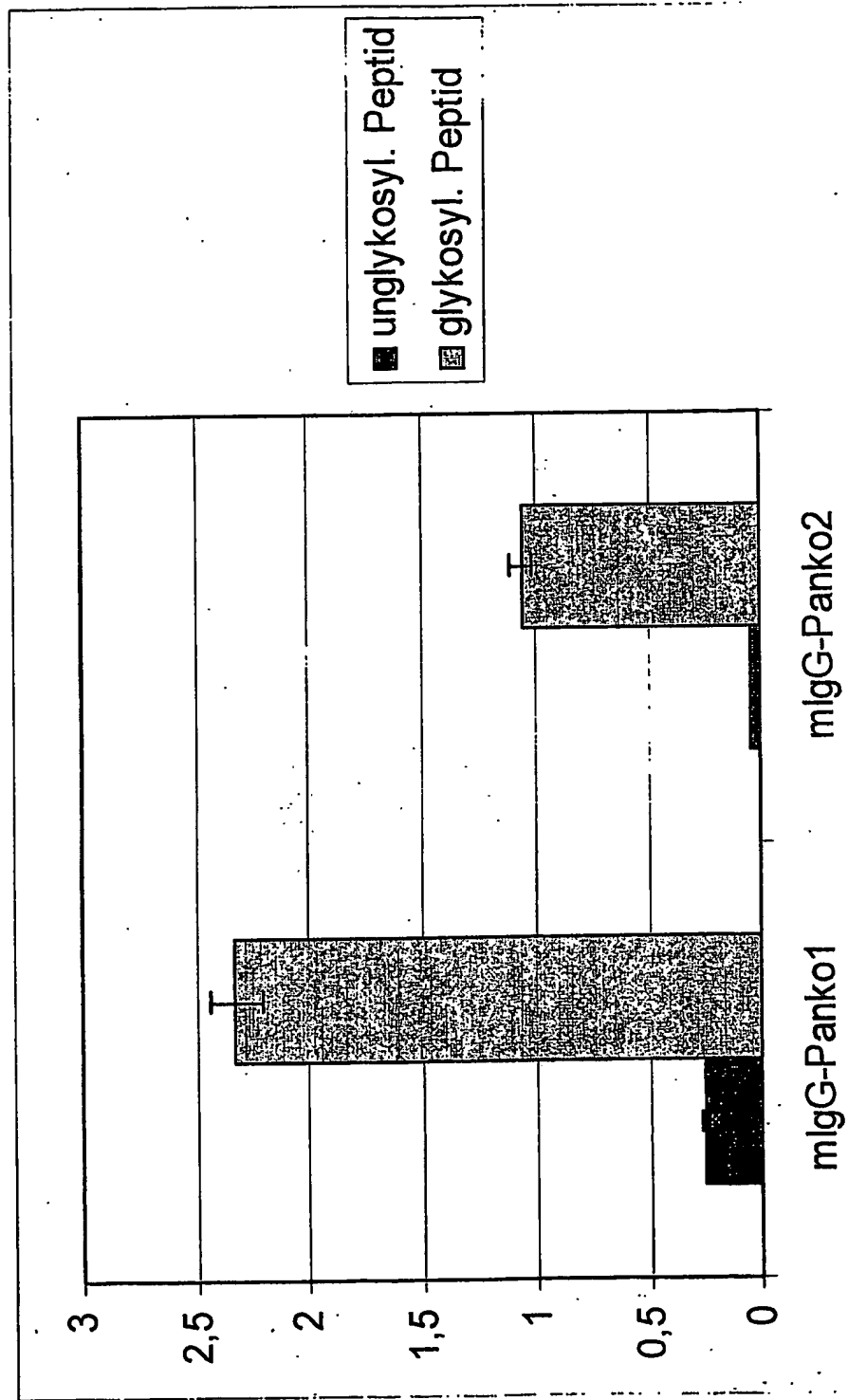


Abb. 5

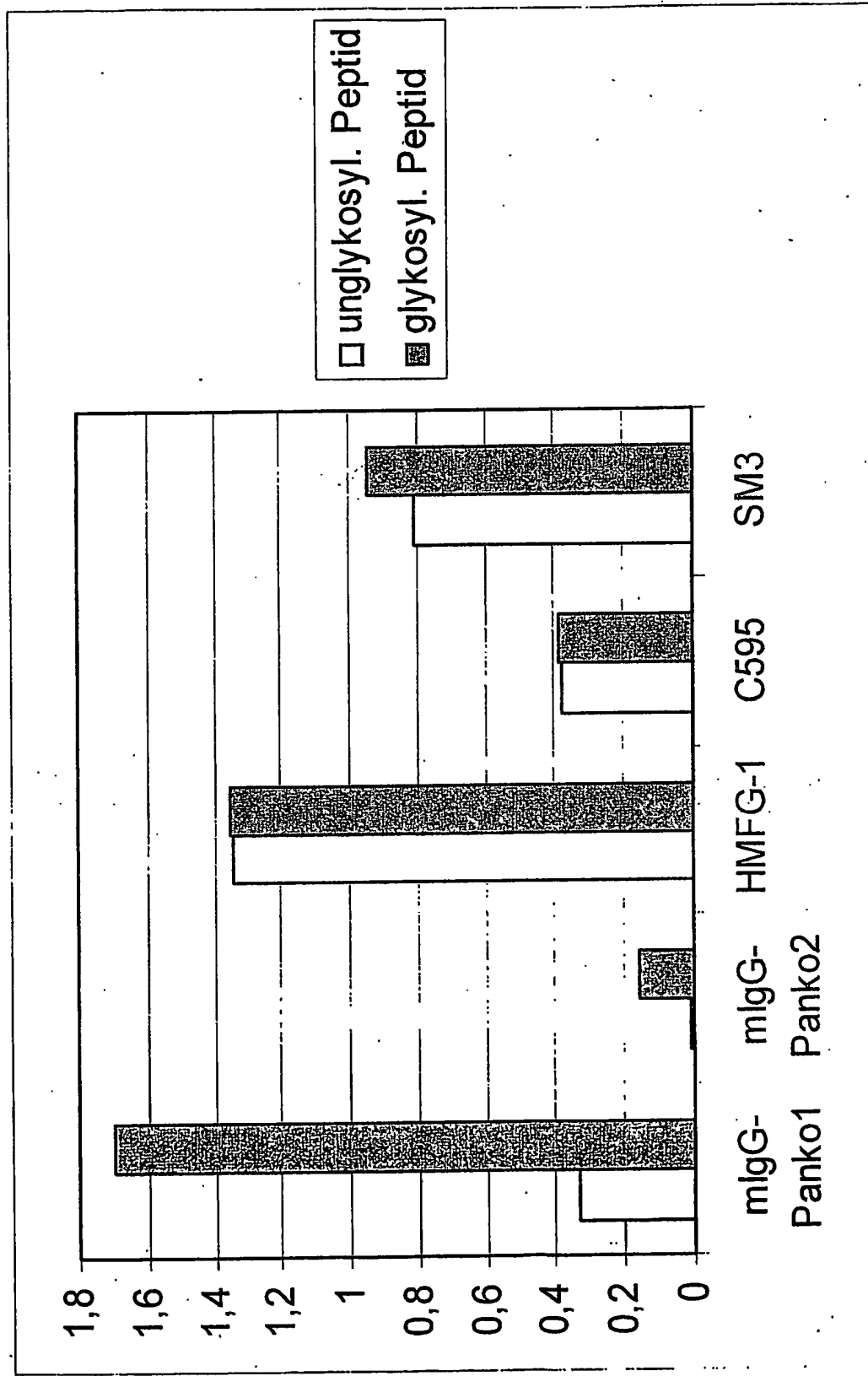




Abb. 6

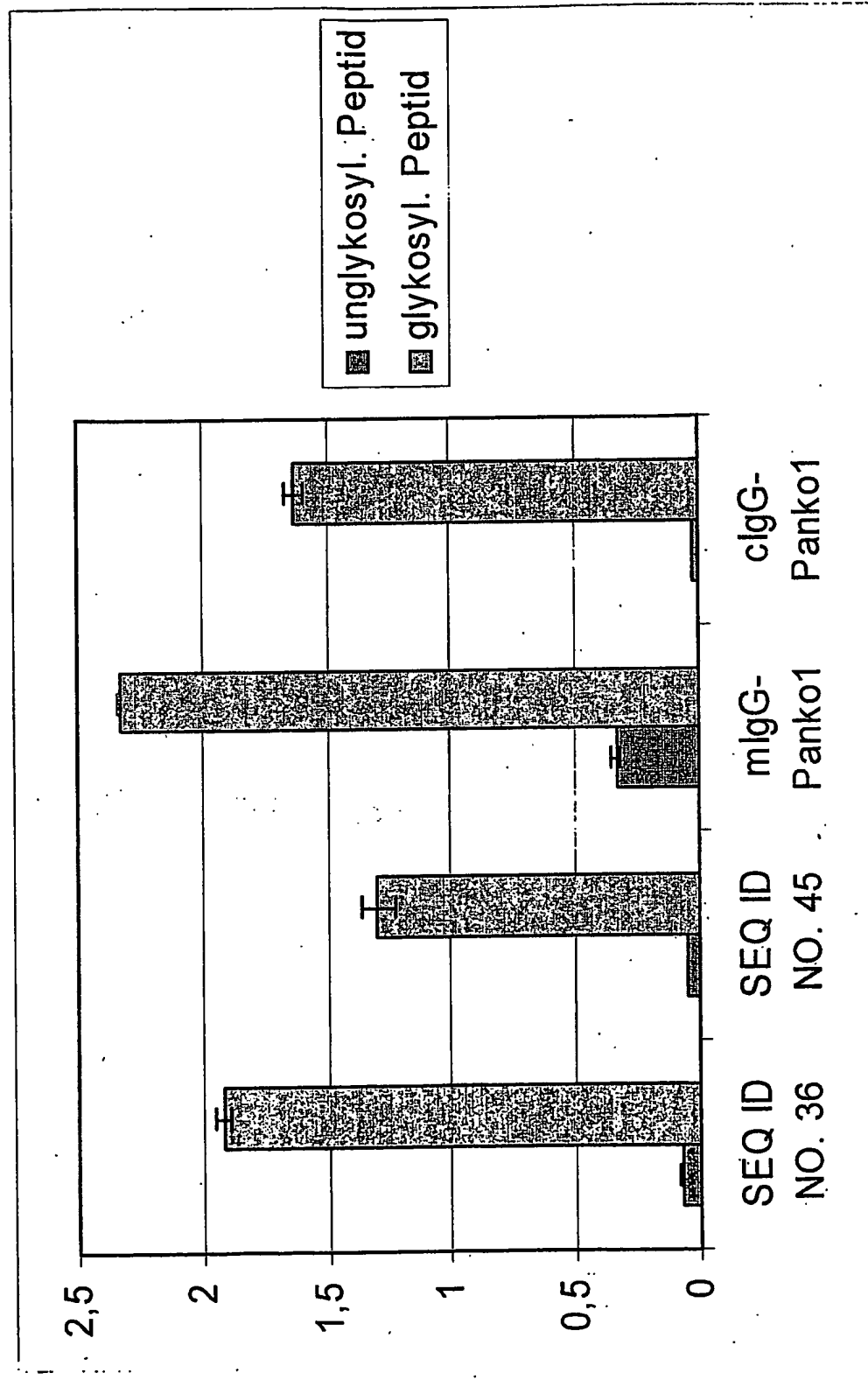


Abb. 7

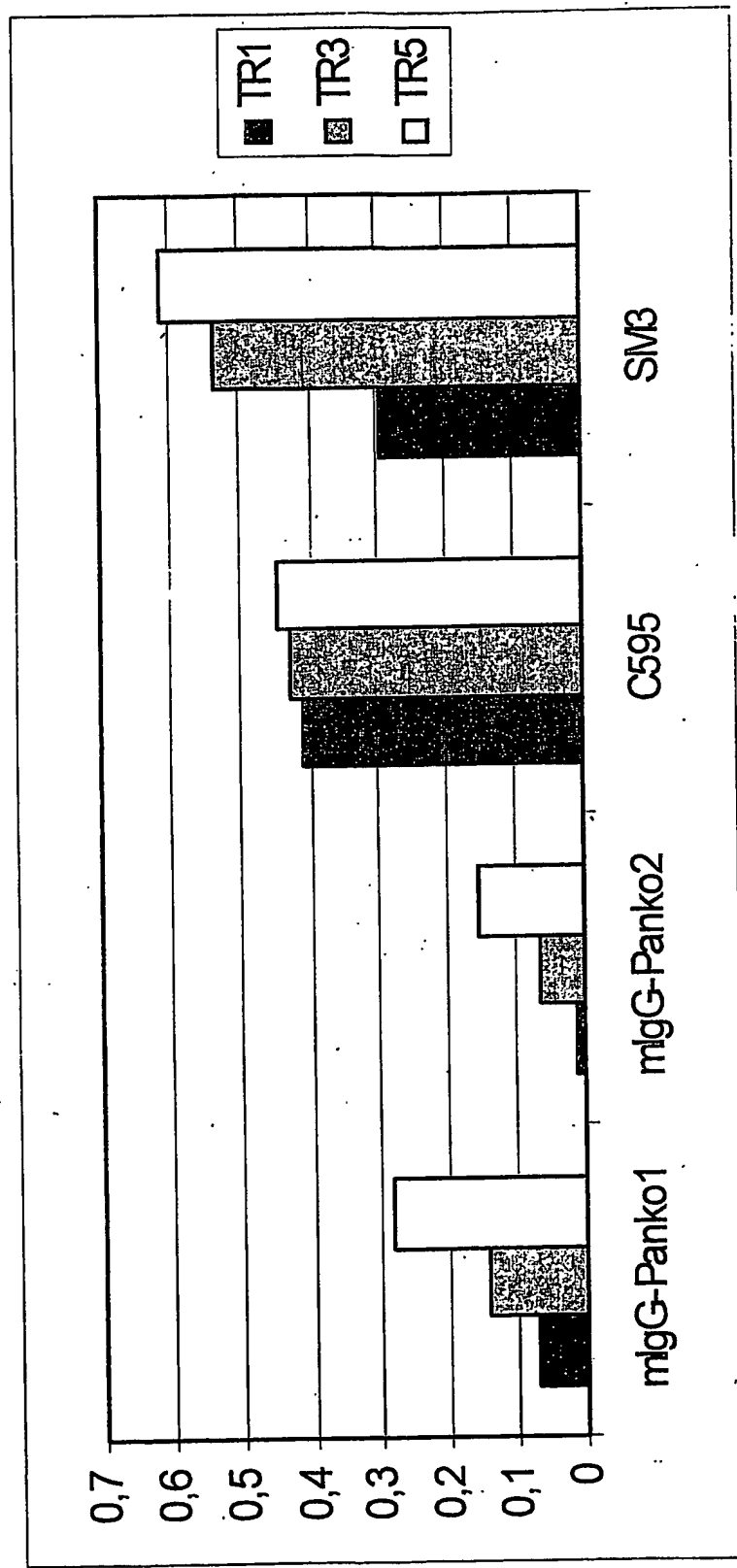


Abb. 8

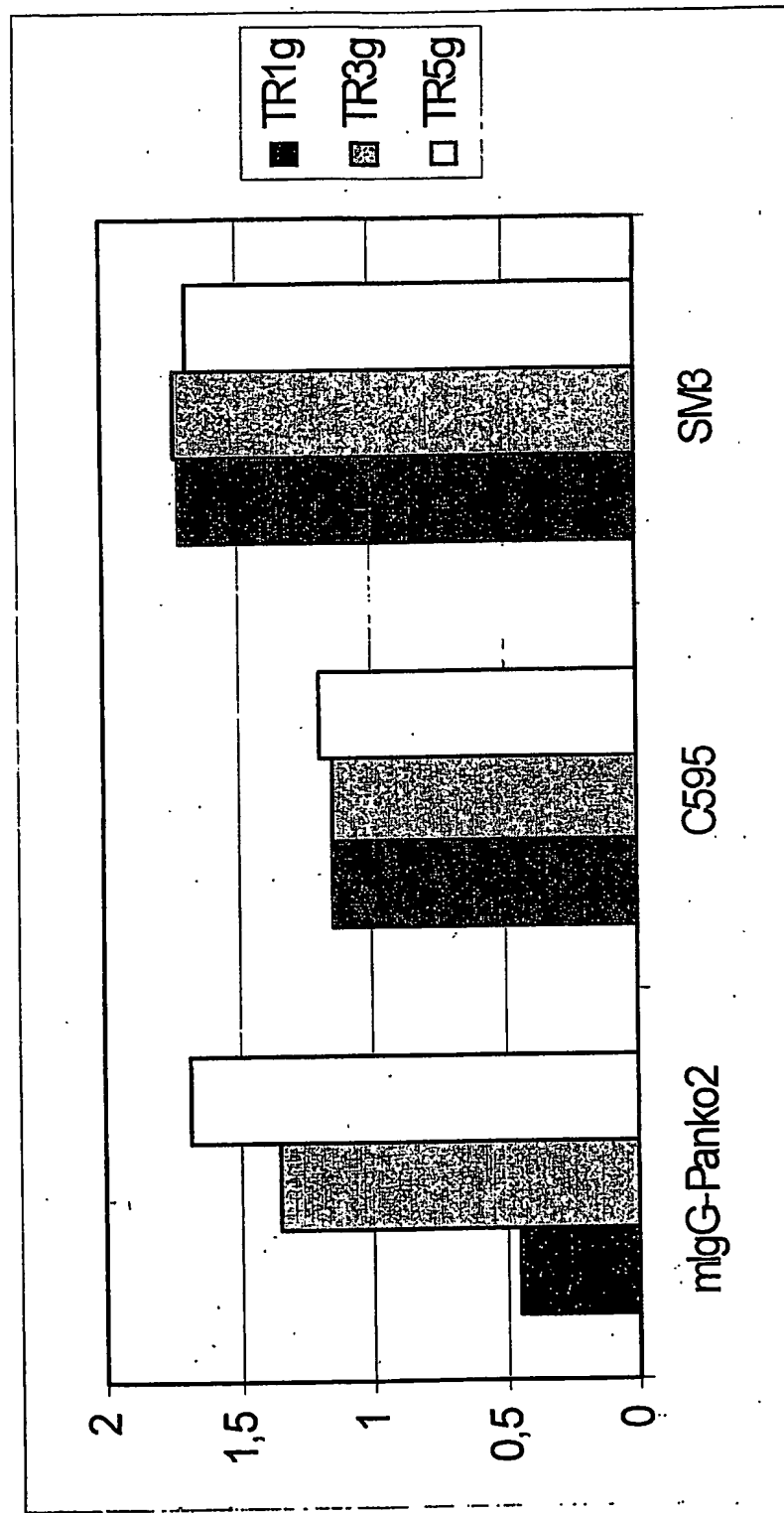
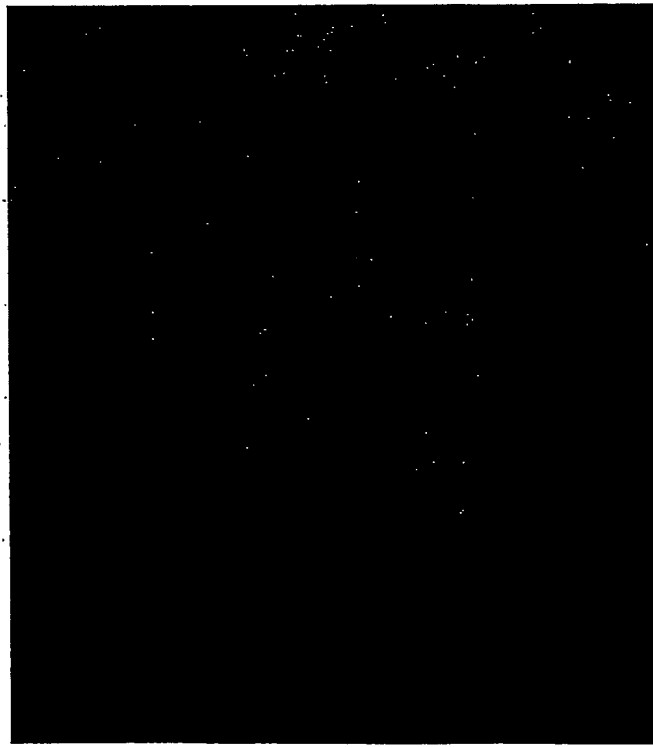




Abb. 9

**Abb. 10**

**Kontrolle**



**cIgG-Panko1**

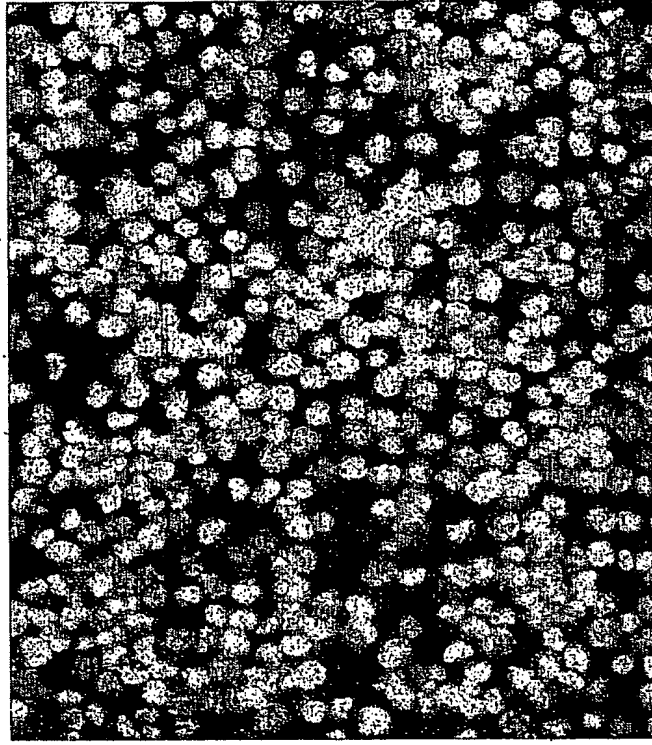


Abb. 11a

$$y = -4,5E+06x + 2,4E+13$$

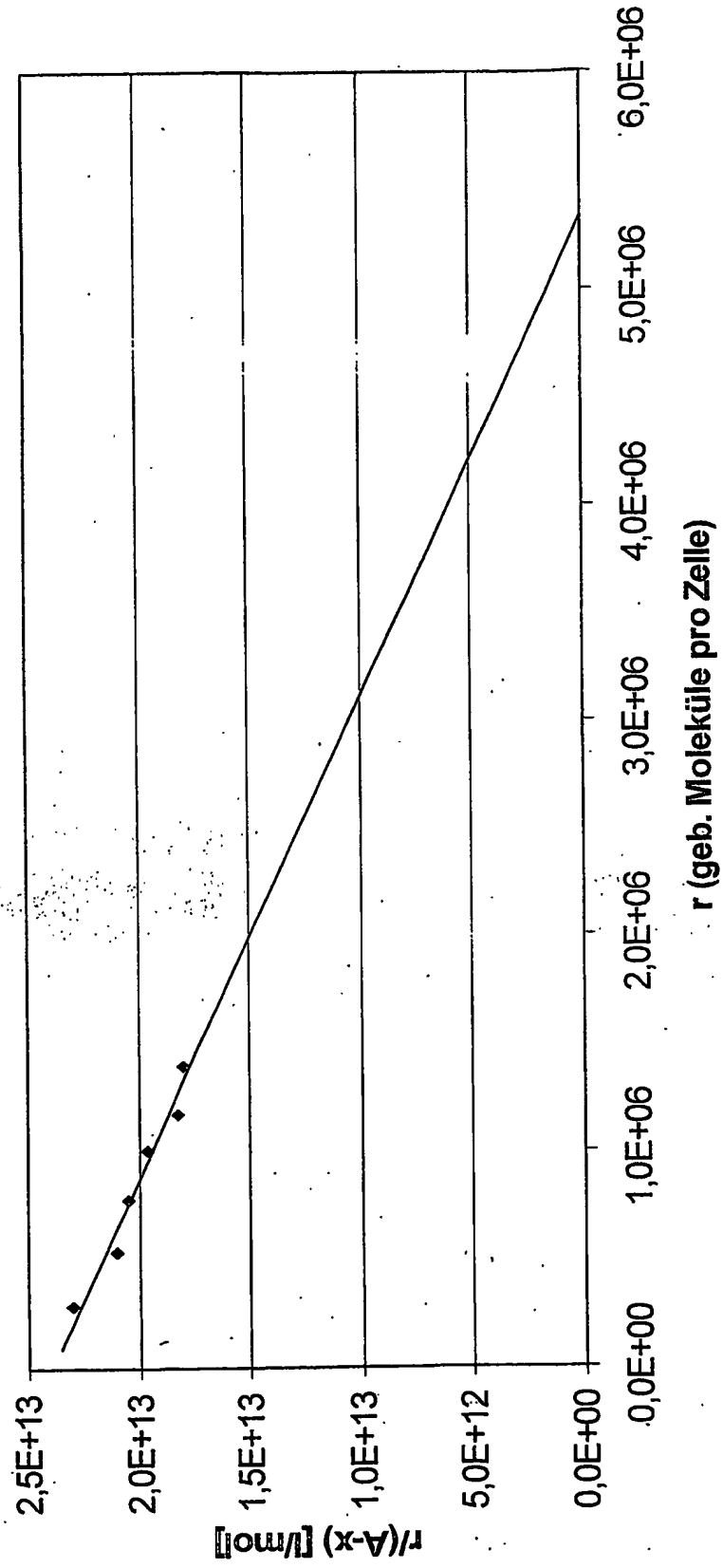


Abb. 11b

$$y = -1,9E+07x + 4,9E+13$$

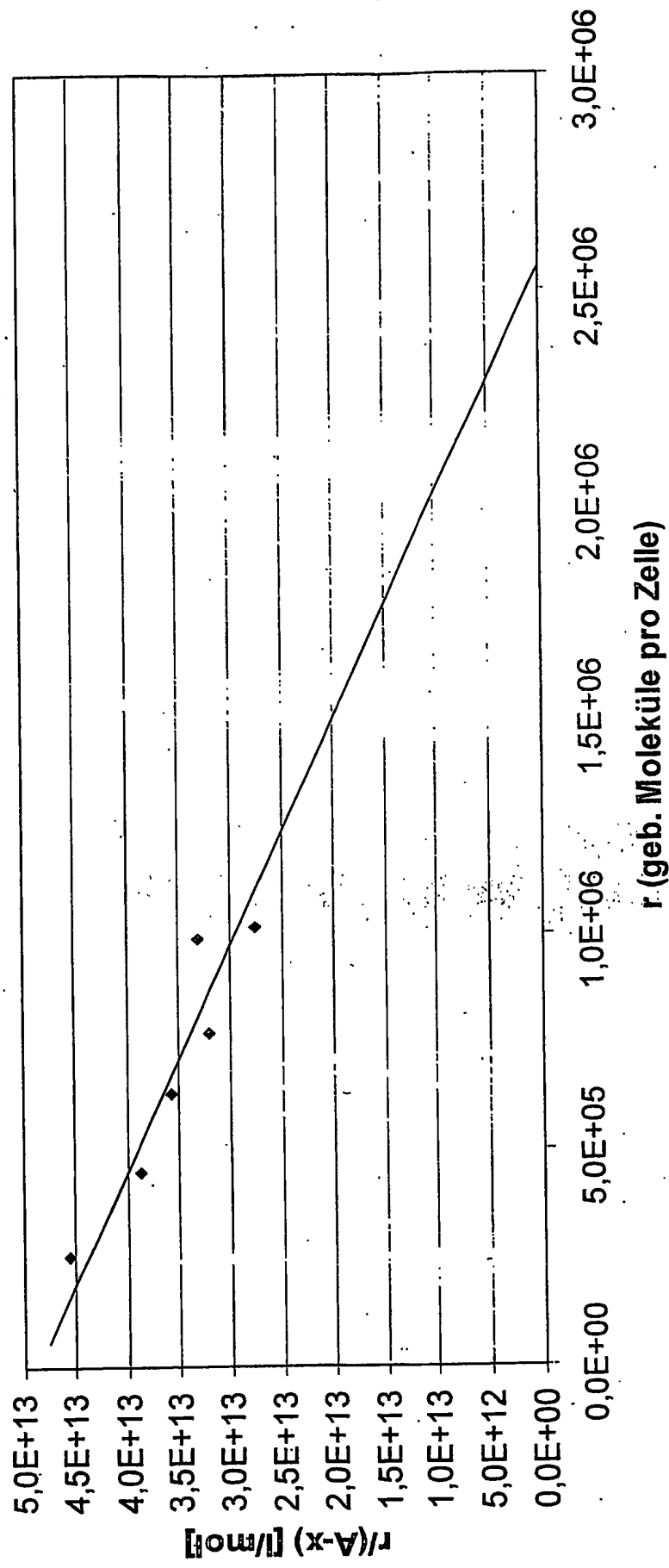


Abb. 12

